

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ESPECIALIDADES MÉDICAS



TESIS DOCTORAL

EVENTOS CELULARES Y TISULARES DETERMINANTES
EN LA FORMACIÓN/REFORMACIÓN DE LAS
ADHERENCIAS OMENTALES EN UN MODELO DE
ADHESIOGÉNESIS EXPERIMENTAL

VERÓNICA GÓMEZ GIL

2009

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ESPECIALIDADES MÉDICAS
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



TESIS DOCTORAL

EVENTOS CELULARES Y TISULARES DETERMINANTES
EN LA FORMACIÓN/REFORMACIÓN DE LAS
ADHERENCIAS OMENTALES EN UN MODELO DE
ADHESIOGÉNESIS EXPERIMENTAL

DIRECTORES:

Dra. Dña. Julia Buján Varela

Dr. D. Juan Manuel Bellón Caneiro

VERÓNICA GÓMEZ GIL

2009



Universidad
de Alcalá

DEPARTAMENTO DE
ESPECIALIDADES MÉDICAS

Facultad de Medicina

Campus Universitario

28871 Alcalá de Henares (Madrid)

Teléfono: 91 885 45 36 – 47 90 / Fax: 91 885 45 94

e.mail: departamento.espm@uah.es

D. JOSÉ LUIS BARDASANO RUBIO, Director del Departamento de Especialidades Médicas de la Universidad de Alcalá

Informa que: el trabajo presentado por Dña. Verónica Gómez Gil, titulado **“EVENTOS CELULARES Y TISULARES DETERMINANTES EN LA FORMACIÓN/REFORMACIÓN DE LAS ADHERENCIAS OMENTALES EN UN MODELO DE ADHESIOGÉNESIS EXPERIMENTAL”**, ha sido realizado en el Departamento de Especialidades Médicas y reúne los requisitos científicos de originalidad y rigor metodológicos exigibles para su consideración como memoria de tesis doctoral

Y para que así conste, se firma la presente en Alcalá de Henares a seis de mayo de dos mil nueve

Fdo.: José Luis Bardasano Rubio
DIRECTOR DE DEPARTAMENTO
ESPECIALIDADES MÉDICAS

Dña. JULIA BUJÁN VARELA, Catedrática de Histología e Ingeniería Tisular del Departamento de Especialidades Médicas y D. JUAN MANUEL BELLÓN CANEIRO, Profesor Titular de Cirugía y Subdirector del Departamento de Cirugía de la Universidad de Alcalá,

CERTIFICAN QUE:

El trabajo de investigación presentado por DÑA VERÓNICA GÓMEZ GIL, titulado **“EVENTOS CELULARES Y TISULARES DETERMINANTES EN LA FORMACIÓN/REFORMACIÓN DE LAS ADHERENCIAS OMENTALES EN UN MODELO DE ADHESIOGÉNESIS EXPERIMENTAL”**, ha sido realizado en el Departamento de Especialidades Médicas y reúne los requisitos científicos de originalidad y rigor metodológicos suficientes para su consideración como memoria de tesis doctoral y ser defendida como tesis doctoral ante el tribunal que legalmente proceda

Y para que así conste, se firma la presente certificación, en Alcalá de Henares a seis de mayo de dos mil nueve

Fdo.: Julia Buján Varela

Fdo.: Juan Manuel Bellón Caneiro

A mi familia,
A Rubén...

AGRADECIMIENTOS

Tras los años dedicados a este trabajo, ha llegado el momento de expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma han contribuido a que esta Tesis viera la luz.

En primer lugar, debo agradecer a los directores de esta Tesis, la Dra. Dña. Julia Buján Varela y el Dr. D. Juan Manuel Bellón, la oportunidad que me brindaron al ofrecerme la posibilidad de formar parte de su equipo y de realizar este trabajo bajo su dirección. Gracias por iniciarme en el mundo de la investigación, por todos los conocimientos transmitidos y por el tiempo y apoyo que me habéis brindado.

A la Dra. Dña. María del Carmen Gianonatti Alias, por estar siempre dispuesta a compartir sus conocimientos, por su colaboración en la revisión de este trabajo y el cariño que siempre me ha mostrado.

Al Dr. D. Natalio García Honduvilla y la Dra. Dña. Gemma Pascual González, excelentes profesores e investigadores que me han guiado en el trabajo de laboratorio. Gracias por vuestra ayuda y los buenos ratos compartidos.

A la Dra. Cay Kielty, por ofrecerme la posibilidad de realizar una estancia en su laboratorio.

Al Dr. D. Francisco Javier García Esteo, por la ayuda ofrecida.

A los compañeros que ya no están en el departamento y a los que comparten cada día conmigo, por orden de aparición: la Dra. Dña. Marta Rodríguez Mancheño, la Dra. Dña. Celia Corrales Gómez, Natalia, Vanessa, Carlos, Cynthia, Soraya, Bárbara, Diana, Alberto, la Dra. Dña. Beatriz Romero, Cristina, Lorena y Sandra. Muchas gracias por vuestra ayuda, vuestros consejos y todas las risas compartidas, que hacen que la palabra “compañero” se quede muy corta.

Gracias, también, a todos aquellos que de algún modo han sido partícipes de esta andadura: Verónica, la Dra. Dña. Silvia Díaz Prado, la Dra. Shazia Chaudhry...

A mis padres y a mi hermano, por estar siempre ahí animándome a continuar. Gracias por apoyarme en cualquier circunstancia. Sabéis lo importante que sois para mí.

Y, por supuesto, a Rubén. Gracias por tu compañía, apoyo incondicional, comprensión, amor y por no dejar que me rinda ante nada. Eres la razón de mi felicidad.

ABREVIATURAS

AH	Ácido hialurónico
BMP	Proteína morfogénica de hueso
CAM	Moléculas de adhesión celular
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EIP	Enfermedad inflamatoria pélvica
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos
GO	Glomérulo omental
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HIF-1 α	Factor inducible por hipoxia-1 α
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IGF	Factor de crecimiento insulínico
IL	Interleucina
LAP	Péptido asociado de latencia
LTBP	Proteína de unión del TGF- β latente
MCP-1	Proteína I quimiotáctica para monocitos
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinasas
NGF	Factor de crecimiento neurotrófico
PAI	Inhibidor del activador del plasminógeno
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PIGF	Factor de crecimiento placentario
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SCF	Factor de células totipotenciales
SDS	Dodecilsulfato sódico
SOD	Superóxido dismutasa

TGF	Factor de crecimiento transformante
TIMP	Inhibidor de metaloproteinasas
TNF	Factor de necrosis tumoral
tPA	Activador tisular del plasminógeno
uPA	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa
uPAR	Receptor del activador del plasminógeno tipo uroquinasa
VCAM	Molécula de adhesión vascular
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	19
1.1 Aspectos conceptuales y clasificación de las adherencias	19
1.2 Epidemiología. Complicaciones relacionadas con la formación adherencial....	21
1.3 El omentum	23
1.4 Fisiopatología de la formación adherencial	25
1.4.1 El proceso fibrinolítico en la formación adherencial.....	26
1.4.2 La célula mesotelial	33
1.4.3 Células mediadoras de la respuesta inflamatoria	38
1.5 Métodos de prevención.....	42
1.5.1 Técnicas quirúrgicas: minimización de la lesión.....	43
1.5.2 Aplicación de adyuvantes.....	45
1.6 La angiogénesis.....	54
1.7 Los factores de crecimiento y las citocinas: Su papel en la curación peritoneal..	57
1.7.1 El factor de crecimiento de endotelio vascular	60
1.7.2 El factor de crecimiento transformante β	64
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	83
3. OBJETIVOS.....	87
3.1 PRIMER OBJETIVO.....	87
3.1.1 Material y métodos.....	87
3.1.2 Resultados.....	111
3.1.3 Conclusiones	154
3.2 SEGUNDO OBJETIVO.....	157
3.2.1 Material y métodos.....	157
3.2.2 Resultados.....	171

3.2.3 Conclusiones	187
3.3 TERCER OBJETIVO.....	189
3.3.1 Material y métodos	189
3.3.2 Resultados.....	195
3.3.3 Conclusiones	212
4. DISCUSIÓN	215
5. CONCLUSIONES	257
6. BIBLIOGRAFÍA	261
7. ANEXOS.....	315

RESUMEN

La formación adherencial peritoneal es una de las principales complicaciones que surgen tras una operación quirúrgica en la mayoría de los pacientes, pudiendo generar diversos problemas clínicos como son obstrucción intestinal, dolor abdominal crónico, infertilidad y el incremento de los tiempos quirúrgicos en procedimientos posteriores, con un alto impacto clínico y económico, además, para el sistema sanitario.

El evento inicial en la formación adherencial es, fundamentalmente, la lesión del peritoneo. Dicha lesión puede ser ocasionada por trastornos inflamatorios, procesos infecciosos (peritonitis bacterianas), infiltración neoplásica (carcinomatosis), estados de isquemia, lesiones por irradiación o traumas durante un procedimiento quirúrgico. Siendo este último caso el que produce una mayor incidencia en la formación adherencial, de manera prácticamente inevitable.

Cuando se produce una lesión en el peritoneo, el contenido hemático que emerge del área dañada da lugar a un exudado de proteínas plasmáticas, que genera un depósito fibrinoso en la cavidad peritoneal capaz de unir dos superficies peritoneales opuestas si éstas entran en contacto. Los principales objetivos de la red de fibrina formada durante la reparación tisular/cicatrización son: la restitución de la integridad del tejido dañado y el soporte de las células que migrarán secuencialmente sobre él. Durante los primeros días tras la lesión, este exudado sufre una degradación enzimática por parte de sustancias fibrinolíticas liberadas localmente, que conducirán al restablecimiento de la capa mesotelial dañada del peritoneo. Sin embargo, son varios los factores capaces de perturbar el equilibrio entre la coagulación y la fibrinólisis en la cavidad peritoneal (la cirugía, la isquemia, la presencia de cuerpos extraños o la infección local), perturbando el equilibrio entre la coagulación y la fibrinólisis en la cavidad abdominal y favoreciendo la formación de depósitos de fibrina en cantidades que exceden la capacidad de degradación de la cavidad peritoneal. Estos coágulos de fibrina son invadidos por capilares y fibroblastos, reemplazando estos últimos la fibrina por otros componentes de la matriz extracelular (principalmente colágeno). Así se forma la adherencia, cuya presencia se sigue encontrando varios daños después del evento que la originó.

En la búsqueda de métodos efectivos en la prevención y/o disminución de la formación adherencial postoperatoria se han empleado una serie de medidas, como son

las que se refieren a una mejora en las técnicas quirúrgicas, limitando el trauma en las estructuras intraabdominales. En este sentido, la técnica laparoscópica presenta mejores resultados que el procedimiento tradicional. Pese al cumplimiento de estos requerimientos, la formación adherencial sigue siendo una complicación postquirúrgica frecuente cuyo fin parece no estar cercano.

Otras de las medidas empleadas son: la aplicación de adyuvantes que modulen la respuesta inflamatoria y/o que intervengan en el balance entre la formación y degradación de la fibrina; y el uso de barreras que eviten el contacto entre las superficies dañadas, impidiendo así que se formen adherencias.

Aunque en la mayoría de los casos ninguna de estas medidas muestra resultados plenamente satisfactorios, los estudios experimentales en prevención adherencial difieren en sus diseños y métodos de evaluación, haciendo difícil la interpretación de los resultados y la comparación entre ellos.

Una vez establecidas las adherencias, la única medida a la que se puede recurrir es la resección quirúrgica. Sin embargo, algunos cirujanos desaconsejan la realización de la adhesiolisis debido al elevado porcentaje de pacientes en los que se produce la reformación adherencial, pudiendo empeorar los síntomas.

La evidencia clínica sobre la eficacia de las terapias empleadas contra la formación adherencial es difícil de evaluar ya que las laparotomías realizadas para una segunda observación que permitan analizar la distribución e intensidad de la reacción peritoneal no son justificables desde el punto de vista ético. Por lo que el abordaje del estudio de la formación adherencial y su prevención hace necesario el empleo de modelos animales.

Ya que todas las investigaciones realizadas en cuanto a la formación adherencial se basan en el ensayo de diferentes medidas preventivas sin atender a la importancia de la citoarquitectura del tejido adherencial o al desarrollo de este, nos planteamos un estudio minucioso y secuencial de este tejido desde el punto de vista histológico e inmunohistoquímico, así como el análisis de la evolución de la expresión génica y proteica de dos de los factores de crecimiento más estrechamente implicados en la formación adherencial.

Como **hipótesis** de trabajo, nos planteamos si era posible definir el momento más adecuado para la resección de las adherencias a partir de las características tisulares del tejido que las constituye, previniendo su reformación.

Para ello, diseñamos un modelo adhesiogénico experimental en conejo blanco de Nueva Zelanda. Nuestro modelo consistió en el implante de una malla de polipropileno sobre el peritoneo parietal, simulando el uso de biomateriales en la reparación de defectos de la pared abdominal. La malla utilizada es de uso común en la clínica y produce frecuentemente la aparición de adherencias en la interfaz prótesis/peritoneo visceral. El modelo empleado no conlleva la sustitución de la pared abdominal, sino la colocación sobre esta. Por lo que es un modelo menos agresivo que los generalmente empleados para la formación de adherencias. Este modelo provoca mayoritariamente la formación de adherencias a partir del omentum, con una proporción muy baja de formación desde la serosa visceral de los órganos intraabdominales. En nuestro estudio hemos centrado nuestro interés en las adherencias de tipo omental, debido al elevado porcentaje de adherencias de este tipo encontrado generalmente en la clínica.

Con la finalidad de dar respuesta a nuestra hipótesis, nos propusimos los siguientes **objetivos**:

- 1) Nuestro **primer objetivo** fue el estudio del tejido adherencial a diferentes tiempos para la valoración de varios aspectos:
 - El conocimiento del proceso de la formación adherencial y su estabilización y evolución en el tiempo, haciendo especial hincapié en la citoarquitectura tisular y el papel funcional de factores de crecimiento implicados en la activación del omentum y el desarrollo adherencial (TGF- β y VEGF).
 - La determinación del momento de estabilización de la adherencia que conduce a su irreversibilidad.

Para llevar a cabo este objetivo, se obtuvieron muestras de tejido adherencial a los 3, 7 y 14 días tras el implante de la malla y de omentum como control. Se realizaron estudios histológicos (tinción con hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson, rojo Sirio para la observación del colágeno y PTAH para fibrina), estudios inmunohistoquímicos, análisis de la expresión proteica mediante Western blot y de la expresión génica mediante RT-PCR. Se realizaron estudios mediante microscopía electrónica de transmisión.

2) Una vez determinado el momento en que el tejido se mostraba estable, se utilizó este tejido como fuente celular para la realización de los estudios *in vitro* que constituyeron nuestro **segundo objetivo**, abordando los siguientes puntos:

- Definición de las características de las células mesenquimales presentes en el omentum activado por el implante del biomaterial.
- Estudio comparativo de su capacidad de proliferación, fenotipo y comportamiento en cultivo con respecto a las células procedentes de las adherencias.

Para ello, se realizó la extracción celular a partir de cada tejido. Los cultivos celulares se sometieron a estudios de proliferación mediante citometría de flujo y conteo mediante azul tripán, caracterización de su fenotipo mediante técnicas inmunohistoquímicas, de inmunofluorescencia y Western blot. Se realizaron estudios mediante microscopía electrónica de transmisión.

3) Partiendo del conocimiento previo hallado en el estudio del tejido adherencial y de la población celular, nos planteamos la evolución de este tejido a tiempos más largos y la posibilidad de la eliminación de esta complicación quirúrgica. Por ello, en nuestro **tercer objetivo** se llevaron a cabo los siguientes puntos:

- Diseño de un modelo de laparoscopia secuencial para la evaluación del proceso de formación/reformación adherencial a corto y largo plazo.
- Estudio de la eficacia de la resección adherencial en la prevención de la reformación adherencial. La elección de este momento se realizó en base a los resultados obtenidos a partir de los objetivos anteriores.
- Análisis de las características tisulares del tejido adherencial a largo plazo (90 días post-implante).

Para ello, se establecieron dos grupos de estudio:

Grupo I (control): Animales sometidos al implante del material protésico (polipropileno).

Grupo II (resección adherencial): Animales sometidos al implante del material protésico y a resección adherencial vía laparoscópica a los 3 días post-implante.

Se evaluó mediante laparoscopia secuencial el porcentaje de la malla cubierta por adherencias a los 3, 7, 14 y 90 días, la capacidad de reformación de las mismas (grupo II)

tras su resección a los 3 días post-implante y la superficie de la malla a los 90 días mediante técnicas histológicas y microscopía electrónica de barrido.

Se obtuvieron las adherencias de 90 días del grupo control para su estudio tisular según las mismas técnicas empleadas en el objetivo 1.

Los **resultados** obtenidos del primer objetivo mostraron que cuando el tejido omental se adhiere al biomaterial, pone en marcha mecanismos de respuesta inmune e inflamatoria, mostrando en las adherencias de 3 días la presencia de macrófagos y linfocitos T CD8 activados. Los parámetros conducentes a la cicatrización se encontraban discretamente iniciados a este tiempo.

El tejido adherencial de 7 días mostró un ambiente claramente inflamatorio, con una gran respuesta de macrófagos y linfocitos activados. Y un incremento significativo en la expresión a nivel proteico de TGF- β 1 maduro, TGF- β 3, VEGF, betaglicano y α -actina de músculo liso. Se encontró una sobreexpresión en la cantidad de colágeno tipo III, tanto a nivel génico como proteico. Se observó un incremento en la celularidad del tejido, la presencia de células mesenquimales y los primeros indicios de su diferenciación celular, que conducían a la formación de dos fenotipos tisulares. Encontramos zonas de regeneración del tejido adiposo y zonas que mostraban un componente fibroso típico de un proceso cicatrizal con presencia miofibroblástica. A la vista de las observaciones inmunohistoquímicas, la formación de un fenotipo u otro parecía correlacionarse con el balance local de TGF- β 1/ TGF- β 3.

A los 14 días, se observó la consolidación y maduración de ambos fenotipos, con una disminución de la reactividad del tejido. Se produjo la maduración del componente colágeno, mostrando una disminución del colágeno tipo III y un predominio del colágeno tipo I. A este tiempo, se observó una sobreexpresión a nivel génico de TGF- β 1, VEGF y colágeno tipo I.

A la vista de estos resultados, se utilizó tejido adherencial de 7 días para la realización de nuestro segundo objetivo. Los resultados obtenidos mostraron que las células procedentes de las adherencias mostraban una mayor tasa de proliferación que las células omentales. Dentro de las poblaciones adherenciales, se observaban diferencias en cuanto a la capacidad proliferativa y su fenotipo entre aquellas células procedentes de

zonas tisulares con fenotipo fibroso y las zonas de regeneración adiposa. Así, era posible identificar marcadores específicos para cada una de las poblaciones, siendo la E-caderina, la podocalixina y la citoqueratina 5 altamente significativos en la población control. Las adherencias fibrosas se caracterizaban por un alto contenido en α -actina de músculo liso y ausencia de desmina y miosina, mientras que la población obtenida a partir de adherencias adiposas mostraba un perfil fenotípico intermedio entre ambas poblaciones. De la valoración de estos y otros parámetros pudimos concluir que el omentum y las adherencias fibrosas constituían tejidos con un perfil de diferenciación establecido mientras que las adherencias adiposas mostraban una población mesenquimal en vías de diferenciación.

En el tercer objetivo, observamos que la resección adherencial a los 3 días post-implante producía una reformación prácticamente nula, mostrando la idoneidad del momento elegido. Las adherencias de 90 días mostraban una composición de tejido adiposo maduro y células mesoteliales, con un perfil inmune mantenido por la presencia de macrófagos y linfocitos T CD4 activados. El tejido mostraba, aún a este tiempo, la presencia elevada de TGF- β 1, TGF- β 3 y betaglicano.

Este perfil constituía una base de alerta inmunológica y tolerancia ante la presencia del cuerpo extraño que es la malla de polipropileno implantada.

De los resultados obtenidos podemos establecer las siguientes **conclusiones**:

- La agresión mecánica producida por la presencia de un biomaterial sobre el omentum, y la reacción inmune/inflamatoria de este último, parecen generar una activación de las células mesenquimales subyacentes para generar un tejido de reparación transitorio y sensible a las señales ambientales que puede culminar en la formación estable de una adherencia omental.
- La reacción a cuerpo extraño del omentum genera una respuesta inmunitaria/inflamatoria cuyo lugar de ubicación y patrón de distribución parece ser relevante en el balance local de las isoformas TGF- β 1 y TGF- β 3, y así, en el tipo de respuesta reparadora del omentum.

- La predominancia de la isoforma TGF- β 1 en el tejido adherencial omental se observa de forma conjunta a la diferenciación de la célula mesenquimal hacia la estirpe miofibroblástica, dando lugar a un proceso cicatrizal donde la contracción juega un papel fundamental. La predominancia de la isoforma TGF- β 3 parece correlacionarse con un proceso regenerativo del tejido adiposo omental.
- La elevada respuesta inflamatoria encontrada a los 7 días (elevada presencia de TGF- β 1, TGF- β 3, VEGF y macrófagos y linfocitos activados) parece favorecer el desencadenamiento de la diferenciación y estabilización tisular.
- La consolidación a largo plazo (90 días) del tejido adherencial y la presencia de glomérulos omentales, macrófagos y linfocitos T CD4 activados en este tejido parecen indicar el mantenimiento o perpetuación de la reacción a cuerpo extraño debido a la presencia del biomaterial e independiente de la lesión mecánica inicial.

Todo lo anterior nos permitió, por tanto, elevar nuestra **hipótesis** a la categoría de **Tesis**, afirmando que:

El análisis detallado y secuencial de los eventos tisulares del tejido adherencial omental nos ha permitido establecer que, a los 3 días post-implante, las adherencias están formadas por un tejido mesenquimal no comprometido ubicado en un ambiente moderadamente inflamatorio, lo que hace de este momento el más idóneo para la prevención eficaz de su reformación tras la resección.

SUMMARY

One of the most common complications of abdominal and pelvic surgery is the formation of peritoneal adhesions. These adhesions can lead to several clinical problems including intestinal obstruction, chronic abdominal pain or infertility and may also prolong subsequent operations with the consequent clinical repercussions and economic impacts for the healthcare system.

The first step in the adhesion formation process involves damage to the peritoneum. This damage can be induced by an inflammatory disorder, infection (bacterial peritonitis), tumour ingrowth (carcinomatosis), ischemia, or by an injury caused by irradiation or by trauma suffered during surgery. This last event produces the greatest incidence of adhesions and is practically unavoidable.

When the peritoneum is wounded, blood emerging from the injured site gives rise to a plasma protein exudate that generates a fibrin deposit in the peritoneal cavity. This deposit has the capacity to join together two opposite peritoneal surfaces if they come into contact with each other. The main goals of this fibrin network that forms during the wound repair/scarring process are: to recover the integrity of the damaged tissue and to support the cells that sequentially migrate onto it. In the first few days of tissue damage, this exudate is enzymatically degraded by locally released fibrinolytic substances that serve to reestablish the peritoneum's damaged mesothelial layer. However, there are many factors that can upset this delicate balance between clotting and fibrin lysis in the peritoneal cavity (e.g., surgery, ischemia, presence of a foreign body or local infection) and this will lead to the formation of large amounts of fibrin exceeding the degradation capacity of the peritoneal cavity. These fibrin clots are invaded by capillaries and fibroblasts, which replace fibrin with other extracellular matrix components (mainly collagen). This is how an adhesion forms, and once formed it will continue to cause damage after the event inducing its formation.

In the search for effective methods to prevent and/or reduce postoperative adhesion formation, several measures have managed to technically improve the surgical procedure and reduce trauma to intraabdominal structures. In effect, the laparoscopic surgery method has provided improved results over the conventional open procedure. Despite these improvements, however, adhesion formation is still a common postsurgery

complication whose resolution seems far from near. Another measure used to combat adhesion formation has been the use of adjuvants to modulate the inflammatory response and/or intervene in the balance between fibrin degradation and synthesis, or barriers to avoid contact between damaged surfaces and thus prevent adhesions forming. Although in most cases these measures have not been completely successful, experimental studies on adhesion prevention have differed in their design and assessment methods, making it difficult to interpret or compare results.

Once adhesions have formed, the only option available is their surgical removal. Notwithstanding, some surgeons do not recommend surgical adhesiolysis because adhesions reform in a large proportion of patients and symptoms sometimes worsen.

Clinical evidence of the efficiency of the measures used against adhesion formation is difficult to assess since it is unethical to perform a second laparoscopic observation to determine the extent and intensity of the peritoneal reaction and this is only undertaken in certain gynaecological procedures. Thus, to address the issue of adhesion formation and prevention animal models are required.

So far, attempts to gain insight into adhesion formation have been based on testing different preventive measures and little attention has been paid to the cytoarchitecture of the adhesion tissue or its development. To this end, we designed an in depth and sequential study of this tissue from both a histological and immunohistochemical perspective, and also analysed the gene and protein expression of two of the growth factors most involved in adhesion formation.

Our **working hypothesis** was whether we could define the most appropriate time for adhesion resection according to the characteristics of the tissue comprising the adhesions to avoid their reformation.

To test this hypothesis, we designed an experimental adhesiogenesis model in the New Zealand White rabbit. Our model involves the implant of a polypropylene mesh over the parietal peritoneum, mimicking the use of a biomaterial to repair an abdominal wall defect. The mesh is one commonly used in clinical practice that often leads to the appearance of adhesions at the prosthesis/visceral peritoneum interface. In the model employed, the abdominal wall is not replaced with the mesh, rather the mesh is placed over it. This makes this model less aggressive than those generally used to examine adhesion formation and mainly induces the formation of adhesions from the omentum,

generating a very low proportion of adhesions arising from the visceral serosa of the intraabdominal organs. In our study, we placed special emphasis on adhesions of the omental type since this is the type most frequently encountered in clinical practice.

The final **objectives** proposed to test our hypothesis were:

- 1) Our **first objective** was to examine adhesion tissue at different time points to assess:
 - The adhesion formation process and its stabilization and progression over time, paying particular attention to tissue cytoarchitecture and the functional role of growth factors incriminated in activating the omentum and adhesion development (TGF- β and VEGF).
 - The moment an adhesion stabilizes and becomes irreversible.

To fulfil this objective, specimens of adhesion tissue were obtained 3, 7 or 14 days after mesh implant. Specimens of native and adhesion-free omentum were also obtained as controls. All specimens were subjected to histological analysis (stained with haematoxylin-eosin, Masson's trichrome, sirius red for collagen and PTAH for fibrin), immunohistochemical procedures, protein expression analysis by Western blotting and gene expression analysis by RT-PCR. Specimens were examined by transmission electron microscopy.

- 2) Once we had determined the time point at which the tissue appeared stable, this tissue was used as the cell source for the *in vitro* studies that comprised our **second objective** designed to:
 - Define the characteristics of the mesenchymal cells present in the omentum activated by the implant of the biomaterial.
 - Compare their proliferation capacity, phenotype and behaviour in culture with respect to the cells from adhesions.

To this end, cells were extracted from each type of tissue (omental and adhesion tissue). Cell cultures were subjected to proliferation studies by flow cytometry and cell counts on trypan blue stained sections as well as phenotype characterization using immunohistochemical, immunofluorescence and Western blotting procedures. Sections were examined by transmission electron microscopy.

3) Based on the findings of our adhesion tissue and cell population study, we addressed the progression of this tissue over a longer time period and the possibility of resolving this surgical complication. Hence, our **third objective** addressed the following points:

- Design of a sequential laparoscopy model to assess the adhesion formation process and adhesion reformation following their resection 3 days after mesh implant in the short and long term.
- Study of the efficiency of this 3-day time point of adhesion resection to prevent adhesion reformation. The choice of this time point was based on the results obtained when we completed the previous objectives.
- Analysis of the characteristics of the adhesion tissue in the long-term (90 days postimplant).

To this end, two study groups were established:

Group I (control): Animals undergoing the implant of a prosthetic biomaterial (polypropylene) according to the adhesiogenesis model described in the first objective.

Group II (adhesion resection): Animals undergoing the implant of the prosthetic material in which adhesion resection was performed laparoscopically 3 days after mesh implant.

By sequential laparoscopy, we assessed the percentage of the mesh covered with adhesions at 3, 7, 14 and 90 days postimplant and their reformation capacity (group II) following their resection at 3 days postimplant. The mesh surface was examined at 90 days using histological and scanning electron microscopy techniques.

Specimens were obtained from control 90-day-old adhesions and this tissue was analysed using the same techniques as for objective 1.

The **results** of the first objective indicated that as soon as the omental tissue adheres to the mesh, this triggers immune and inflammatory response mechanisms. In the 3-day adhesions, the presence of activated macrophages and CD8 T lymphocytes was observed. The events leading to scarring were discretely observed at this time.

At 7 days, the adhesion tissue showed a clearly inflammatory environment, including an intense activated macrophage and lymphocyte response. Also observed, was

a significant increase in the expression at the protein level of mature TGF- β 1, TGF- β 3, VEGF, betaglycan and smooth muscle α -actin. We noted the overexpression of collagen type III, both at the gene and protein levels. Further observations were increased tissue cellularity, the presence of mesenchymal cells and the first signs of cell differentiation towards two tissue phenotypes. We detected zones of regenerated adipose tissue and zones that showed a fibrous component typical of a scarring process with the presence of myofibroblasts. In view of these immunohistochemical observations, the formation of one phenotype or the other seemed to be related to the local TGF- β 1/ TGF- β 3 balance.

At 14 days, both phenotypes appeared consolidated and mature and the tissue was less reactive. The collagen component was more mature as indicated by a reduction in collagen type III and predominance of collagen type I. At this time point, we also observed the genetic overexpression of TGF- β 1, VEGF and collagen type I.

According to these results, we used the 7-day adhesion tissue to address our second objective. The results obtained indicated a higher proliferation rate of adhesion tissue cells than the omental cells. Within the adhesion cell populations, differences were observed in terms of the proliferative capacity and phenotype of cells obtained from different tissue zones. Cells from some zones displayed a fibrous phenotype and other zones showed adipose regeneration. Thus, it was possible to identify specific markers for each population, with E-cadherin, podocalyxin and cytokeratin 5 being highly prevalent in the control cell population. Fibrous adhesions are characterized by their high smooth muscle α -actin content and lack of desmin and myosin, and the cell population obtained from the adipose adhesions showed an intermediate phenotype between the two populations. Collectively, these findings indicate that the omentum and fibrous adhesions comprise tissues with an established differentiation profile while adipose adhesions show a mesenchymal population in the process of differentiation.

While addressing our third objective, we observed that adhesion resection 3 days after mesh implant is followed by practically null adhesion reformation indicating the suitability of the time point selected. Adhesions at 90 days showed a composition comprising mature adipose tissue and mesothelial cells, with an immune profile maintained by the presence of activated macrophages and CD4 T lymphocytes. Even at

this time point, the tissue showed the intense presence of TGF- β 1, TGF- β 3 and betaglycan.

This profile forms the basis of an immunological warning and tolerance when faced with the presence of the foreign body represented by the implanted polypropylene mesh.

From the results obtained, the following **conclusions** can be drawn:

- The mechanical aggression produced by the presence of a biomaterial on the omentum, and the immune/inflammatory response of this tissue seem to cause activation of the underlying mesenchymal cells to generate a transient repair tissue that is sensitive to environmental signals. This process may culminate in the stable formation of an omental adhesion.
- The foreign body reaction of the omentum generates an immune/inflammatory response whose site and distribution pattern seem to be related to the local balance of the TGF- β 1 and TGF- β 3 isoforms, and therefore to the type of repair response shown by the omentum.
- The predominance of the TGF- β 1 isoform in the omental adhesion tissue is accompanied by the differentiation of the mesenchymal cell towards the myofibroblast, giving rise to a scarring process in which wound contraction plays an essential role. The prevalence of the TGF- β 3 isoform seems to correlate with the regeneration of the omental adipose tissue.
- The intense inflammatory response produced at 7 days (high amounts of TGF- β 1, TGF- β 3, VEGF and activated macrophages and lymphocytes) seems to trigger cell differentiation and tissue stability.
- The long term consolidation (90 days) of adhesion tissue and the presence of omental glomeruli (milky spots) and activated macrophages and CD4 T lymphocytes in this tissue points to a persistent or self-perpetuating foreign body reaction irrespective of the initial mechanical aggression.

Based on these findings, we were able to raise our starting **hypothesis** to the category of **thesis** and conclude that:

Through this detailed and sequential analysis of events occurring in omental adhesion tissue, we were able to establish that at 3 days post mesh implant, adhesions are

composed of a non-committed mesenchymal tissue located in a moderately inflammatory environment. This seems to be the best time point to successfully avoid adhesion reformation following resection.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ASPECTOS CONCEPTUALES Y CLASIFICACIÓN DE LAS ADHERENCIAS

Las adherencias intraabdominales son uniones anormales de tejido cicatricial entre diferentes superficies peritoneales que ocurren frecuentemente después de cualquier cirugía abdominal o pélvica.

Son numerosas las clasificaciones realizadas a lo largo de la historia según los diferentes autores (Mage y cols., 1995; Fiedler y cols., 1996). Se pueden clasificar según su origen, su localización anatómica o su consistencia.

1. Según su **origen**, podemos encontrar:

- adherencias congénitas
- adherencias adquiridas

Las **adherencias congénitas** están presentes desde el nacimiento y son debidas a una anomalía embriológica durante el desarrollo de la cavidad peritoneal. Las **adherencias adquiridas** pueden subdividirse en adherencias inflamatorias o postquirúrgicas. Las adherencias inflamatorias aparecen tras procesos inflamatorios intraabdominales como la apendicitis, la colecistitis aguda, la diverticulitis aguda, la enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) y el uso previo de dispositivos contraceptivos intrauterinos.

No se conoce la proporción exacta de cada uno de estos tipos de adherencias, pero sí que la inmensa mayoría son adherencias postquirúrgicas. Este tipo de adherencias aparecen como consecuencia de la fusión de superficies tisulares dañadas.

Los factores asociados a la formación de adherencias postquirúrgicas incluyen el trauma, la agresión térmica, la abrasión, la infección bacteriana, la irradiación, la isquemia, la presencia de cuerpos extraños como el talco de los guantes empleados durante los procedimientos quirúrgicos o las suturas (Ellis, 1982). Así, existe una relación entre el material extraño, los granulomas producidos por reacción a cuerpo extraño y la formación adherencial. De manera que es corriente encontrar adherencias postquirúrgicas tras la realización de una cirugía gastrointestinal (colecistectomía, gastrectomía, apendicectomía, colectomía, o resección abdominoperineal), cirugía

ginecológica (histerectomía), cirugía rectal y del colon, radioterapia, peritonitis química o diálisis peritoneal.

2. Según su **localización anatómica**:

- visceroparietales, aquellas que se forman entre el peritoneo visceral y el peritoneo parietal.
- visceroviscerales, aquellas que se forman entre el peritoneo visceral de dos órganos.
- visceroepiploicas, aquellas que se forman entre el peritoneo visceral y el epiplón u omentum.
- epiploicoparietales, aquellas que se forman entre el epiplón u omentum y el peritoneo parietal.

Una de las clasificaciones más empleadas es la de Nair y cols. (Nair y cols., 1974), que tiene en cuenta tanto la localización como la extensión y número de las adherencias.

3. Según su **consistencia y/o composición**, se han realizado diversas clasificaciones (Leach y cols., 1998; Celebioglu y cols., 1999).

La más utilizada (Mage y cols., 1986; Diamond y cols., 1987; Luciano y cols., 1989; Nezhat y cols., 1990; Best y cols., 1992; Yarali y cols., 1994; Li y Cooke, 1994; Ordóñez y cols., 1997) es la clasificación hecha por Madelenat y Palmer (Madelenat y Palmer, 1979). Proponen clasificar las adherencias en tres tipos:

- a) Adherencias laxas y avasculares
- b) Adherencias gruesas, opacas y vasculares
- c) Adherencias densas y cohesivas

Bellón y cols. (Bellón y cols., 1996) realizaron una clasificación con ligeras variaciones en la que definen las adherencias como:

- a) laxas
- b) firmes
- c) integradas

Como **adherencia laxa** entendemos la de consistencia muy elástica, aspecto transparente, apenas vascularizada y fácilmente liberable. La **firme** es aquella de consistencia más fibrosa, vascularizada, y que requiere sección con objeto cortante. Finalmente, en la **integrada**, la unión entre el peritoneo parietal y el peritoneo visceral se

hace de una forma íntima, es de consistencia fibrosa y difícil de disecar con objeto cortante.

1.2 EPIDEMIOLOGÍA. COMPLICACIONES RELACIONADAS CON LA FORMACIÓN ADHERENCIAL.

La formación adherencial intraabdominal postoperatoria es uno de los principales problemas que surgen tras una operación quirúrgica. Es una complicación inevitable en cualquier tipo de cirugía intraabdominal, presentándose en un elevado porcentaje de pacientes. Las cifras oscilan entre un 70% (Weibel y Majno, 1973) y un 93% de los pacientes (Menzies y Ellis, 1990).

Las adherencias derivadas de la cirugía abdominal y ginecológica continúan teniendo un alto impacto clínico y económico para el sistema sanitario, ya que su epidemiología no ha variado en los últimos 10 años. Siguen siendo un problema que pasa desapercibido y que no se plantea adecuadamente.

La principal causa de formación de adherencias es, sin lugar a dudas, la cirugía previa (70-95% de todos los casos), seguida de la enfermedad inflamatoria intestinal (8-12%), adherencias de origen congénito (5-9%) y espontáneas o idiopáticas (<1%) (Menzies y Ellis, 1990; Perry y cols., 1955). La incidencia real de las adherencias peritoneales postquirúrgicas se desconoce. Según los estudios publicados, se estima que se presentan en un 67-100% de las cirugías abdominales y en un 97% de las cirugías pélvicas (Nemir, 1952; Weibel y Majno, 1973; Menzies y Ellis, 1990; Liakakos y cols., 2001). Las cirugías involucradas más frecuentemente en la formación adherencial son las cirugías abdominales mayores, tanto electivas como de urgencia, laparotomías por peritonitis generalizada, trauma intestinal y laparotomía para la realización de adhesiolisis (Nemir, 1952; Perry y cols., 1955; Räf, 1969; Menzies y Ellis, 1990;). Laparotomías por enfermedad inflamatoria intestinal, endometriosis y tumores ginecológicos, son otras intervenciones que conducen con frecuencia a adherencias intraperitoneales, incluidas las pélvicas (Monk y cols., 1994).

Asimismo, se ha observado que la formación adherencial es mucho más frecuente en mujeres, debido a las adherencias abdominopélvicas ocasionadas por las patologías y cirugías gineco-obstétricas (Menzies y Ellis, 1990; Sepilian y cols., 2007; Practice

Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Society of Reproductive Surgeons, 2007; Salim y cols., 2008).

Las adherencias en el campo quirúrgico pueden presentar un beneficio potencial, ya que favorecen la neovascularización de estructuras isquémicas como las anastomosis, suministrando un aporte sanguíneo extra al tejido isquémico. Además, separan o “bloquean” las áreas infectadas para evitar que se extiendan a toda la cavidad peritoneal.

Si la formación adherencial es excesiva, en la gran mayoría de los casos son responsables de problemas clínicos, que se presentan con un amplio rango de síntomas dependientes de la localización, grado de rigidez y distribución en la cavidad peritoneal. Las principales complicaciones que generan son: obstrucción intestinal, dolor abdominal crónico, incremento de los tiempos quirúrgicos e infertilidad.

La **obstrucción intestinal** por adherencias intraperitoneales puede ser parcial o total, dependiendo del grado de extensión y rigidez de las mismas. Las adherencias pueden obstruir un asa intestinal por angulación, por torsión o por constricción. Son la causa más común de obstrucción intestinal en el mundo occidental, constituyendo entre un 60-70% de las obstrucciones del intestino delgado (Ellis, 1998). La tasa de mortalidad por obstrucción intestinal producida por adherencias se encuentra entre el 6 y el 15% (Wilson y cols., 1999; Treutner y Schumpelick, 2000; van der Krabben y cols., 2000).

Otra secuela importante de las adherencias es el **dolor abdominal/pélvico crónico**. Así, investigaciones recientes han puesto de manifiesto que el 40% de los pacientes que acudían a las consultas a causa de dolor pélvico crónico padecían adherencias. La enfermedad adherencial pélvica, ya sea postoperatoria o producida por una reacción inflamatoria pélvica, y la endometriosis, son los cambios morfológicos más comunes observados en mujeres con dolor pélvico, causados posiblemente por adherencias ováricas.

Los dolores abdominal y pélvico podrían venir causados por la tensión y tracción a la que están sometidos los órganos pélvicos, que estimulan los receptores del dolor en el peritoneo, así como por la restricción de la movilidad o capacidad de expansión de los órganos pélvicos. La asociación entre la presencia de adherencias y el dolor está clara, al encontrarse una reducción de éste último tras la adhesiolisis en un 60-90% de los casos (DeCherney y diZerega, 1997).

Las adherencias tienen consecuencias importantes para el paciente, el médico y el sistema sanitario. El alto número de intervenciones y reintervenciones que conllevan conduce a estancias hospitalarias más largas e incremento de costes. Su presencia dificulta el acceso a la cavidad abdominal, aumentando así el tiempo quirúrgico necesario en una reintervención. Un informe realizado por Ray y cols. (1998) demuestra que la adhesiolisis fue responsable de 303.836 hospitalizaciones (el 1% del total de hospitalizaciones) durante el año 1994 en Estados Unidos, principalmente en procedimientos del aparato digestivo o del aparato reproductor femenino. El coste médico y de la hospitalización ascendía a 1.3 billones de dólares, con un número total de 846.415 días de hospitalización.

Las adherencias son responsables del 15-20% de los casos de **infertilidad** secundaria en mujeres (Menzies y Ellis, 1990). De hecho, las tasas de embarazo se ven aumentadas entre un 38-52% en pacientes estériles sometidos a una laparotomía con adhesiolisis.

1.3 EL OMENTUM

El omentum o epiplón se encuentra en la cavidad abdominal y está formado por pliegues peritoneales complejos que proporcionan apoyo, recubrimiento y protección al contenido peritoneal. El epiplón está dividido en dos regiones:

- a) el **epiplón menor**, que va fijado desde el hígado hasta la curvatura menor gástrica y primera parte del duodeno.
- b) el **epiplón mayor**, que pende desde la curvatura mayor del estómago y recubre el colon transversal, al cual se fija su superficie posterior. Se dispone como un delantal entre la pared anterior del abdomen y las vísceras abdominales, otorgando a éstas una capa protectora y aislante (Hosgood, 1990; Liebermann-Meffert, 2000).

Está formado por tejido conectivo laxo irrigado por abundantes vasos sanguíneos y linfáticos, y recubierto por mesotelio. En las zonas más densas se encuentran macrófagos, pequeños linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y células mastocíticas.

Ha sido descrito como una estructura linfo-mieloide asociada a celoma (Pinho y cols., 2005), en la que encontramos unas estructuras organizadas a modo de folículos

linfoides que reciben el nombre de manchas o cuerpos lechosos. Este nombre deriva del término inglés *milky spot*, acuñado por Ranvier en 1874 (van Vugt y cols., 1996). Debido a su distribución, composición y morfología pueden denominarse glomérulos omentales (GO) (Shimotsuma y cols., 1993; Platell y cols., 2000).

Son acúmulos de pequeños linfocitos y células fagocíticas (Garosi y Di Paolo, 2001) que adquieren forma esférica y se encuentran rodeados de capilares linfáticos que drenan al folículo (**figura 1**). Cuando se activan, estas células se transforman en inmunoblastos, pudiendo diferenciarse a células de memoria o a células efectoras con capacidad de mediación de la respuesta inmunitaria. Diseminando, de esta forma, la respuesta inmunológica a la cavidad peritoneal. Aunque estos glomérulos se encuentran en gran número en el omentum, también han sido observados en la pleura, el pericardio y la región del eje esplenoportal (Takemori y cols., 1995).

El omentum desarrolla diversas funciones: es un lugar de almacenamiento de lípidos y de células inflamatorias peritoneales y regula el intercambio de fluidos hacia y desde la cavidad peritoneal. La naturaleza linfoide de los GO le otorgan, además, las funciones típicas de este tipo de tejidos.

A comienzos del siglo XX, el cirujano británico Rutherford Morrison observó que el epiplón tendía a aislar áreas de infección. Presenta una elevada capacidad angiogénica y se adhiere íntimamente a los focos intraperitoneales de inflamación, isquemia, infección o traumatismo facilitando la activación de la coagulación en estas zonas. Debido a estas propiedades, el omentum se ha empleado en diferentes aplicaciones clínicas reconstructivas y de revascularización (Vineberg, 1967; Casten y Alday, 1971; McLean y Buncke, 1972; Goldsmith y cols., 1975; Azuma y cols., 1976; Ohtsuka y cols., 1980; Alakulju y Virkkula, 1990; Herrera y cols., 1991; Talwar y cols., 1998).

Estas características hacen del omentum un órgano particularmente susceptible a la formación adherencial, hasta el punto de estar involucrado en esta patología en un 92% de los pacientes afectados de adherencias postoperatorias y en un 100% de las adherencias espontáneas en pacientes no sometidos a cirugía previa (Weibel y Majno, 1973).

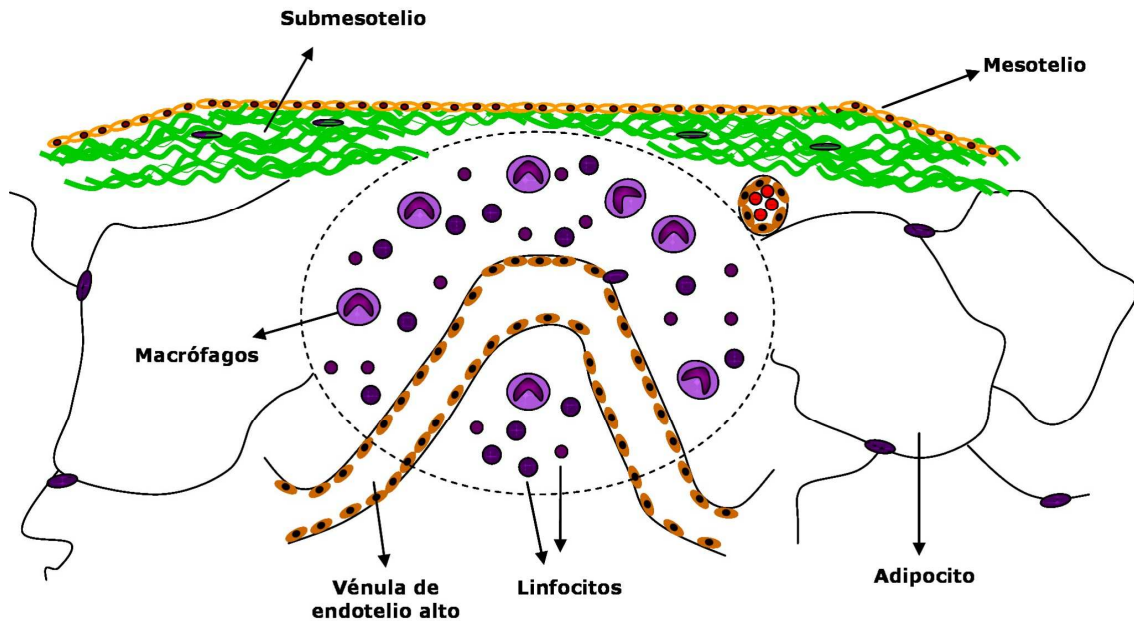


Figura 1: Esquema representativo de la estructura básica de un glomérulo omental (*milky spot*) en el omentum. Modificado de Platell y cols. (2000).

1.4 FISIOPATOLOGÍA DE LA FORMACIÓN ADHERENCIAL

El primer paso para tratar de evitar una dolencia o trastorno, consiste en conocer los mecanismos por los que se produce. Por eso, para abordar la prevención de la formación adherencial resulta vital conocer su fisiopatología.

El evento inicial en la formación adherencial es, fundamentalmente, la lesión del peritoneo. Dicha lesión puede ser ocasionada por un trauma (cirugía, lesión por agresión,...), por trastornos inflamatorios (ileitis, colitis ulcerosa, EIP), procesos infecciosos (peritonitis bacterianas), infiltración neoplásica (carcinomatosis), estados de isquemia o lesión por irradiación.

El estudio de las adherencias peritoneales postquirúrgicas reviste una gran dificultad, debido a los distintos sistemas que se integran en el proceso de la reparación peritoneal: cascadas de la coagulación, respuesta de las células mesoteliales, respuesta inflamatoria, proceso de cicatrización, etc.

1.4.1 EL PROCESO FIBRINOLÍTICO EN LA FORMACIÓN ADHERENCIAL

Cuando se produce una lesión en el peritoneo, el contenido hemático que emerge del área dañada da lugar a un exudado de proteínas plasmáticas, que generará un depósito fibrinoso en la cavidad peritoneal. En primer lugar, el fibrinógeno, una proteína soluble presente en la sangre, es procesada por la trombina para crear el monómero de fibrina. Los monómeros polimerizan, dando lugar a un polímero de fibrina soluble.

Así, se formará una red de fibrina que, debido a su naturaleza viscosa, es capaz de unir dos superficies peritoneales opuestas si éstas entran en contacto. El mecanismo de formación de una adherencia de tipo fibrinoso se ve favorecido cuando ambas superficies han sido dañadas (Haney y Doty, 1994).

Los principales objetivos de la red de fibrina formada durante la reparación tisular o proceso de cicatrización son: la restitución de la integridad del tejido dañado y el soporte de las células que migrarán secuencialmente sobre él. Durante los primeros días tras la lesión, este exudado sufre una degradación enzimática por parte de sustancias fibrinolíticas liberadas localmente. Sin embargo, la inflamación post-traumática puede favorecer la formación de estas adherencias fibrinosas en cantidades que excedan la capacidad de degradación de la cavidad peritoneal.

En este proceso inflamatorio juegan un importante papel los neutrófilos, especialmente en las primeras 24 horas tras la lesión. También los macrófagos desempeñan su función, ya que facilitan la llegada de células mesoteliales al lugar de la herida y liberan citocinas como el PDGF, el VEGF y el TGF- β .

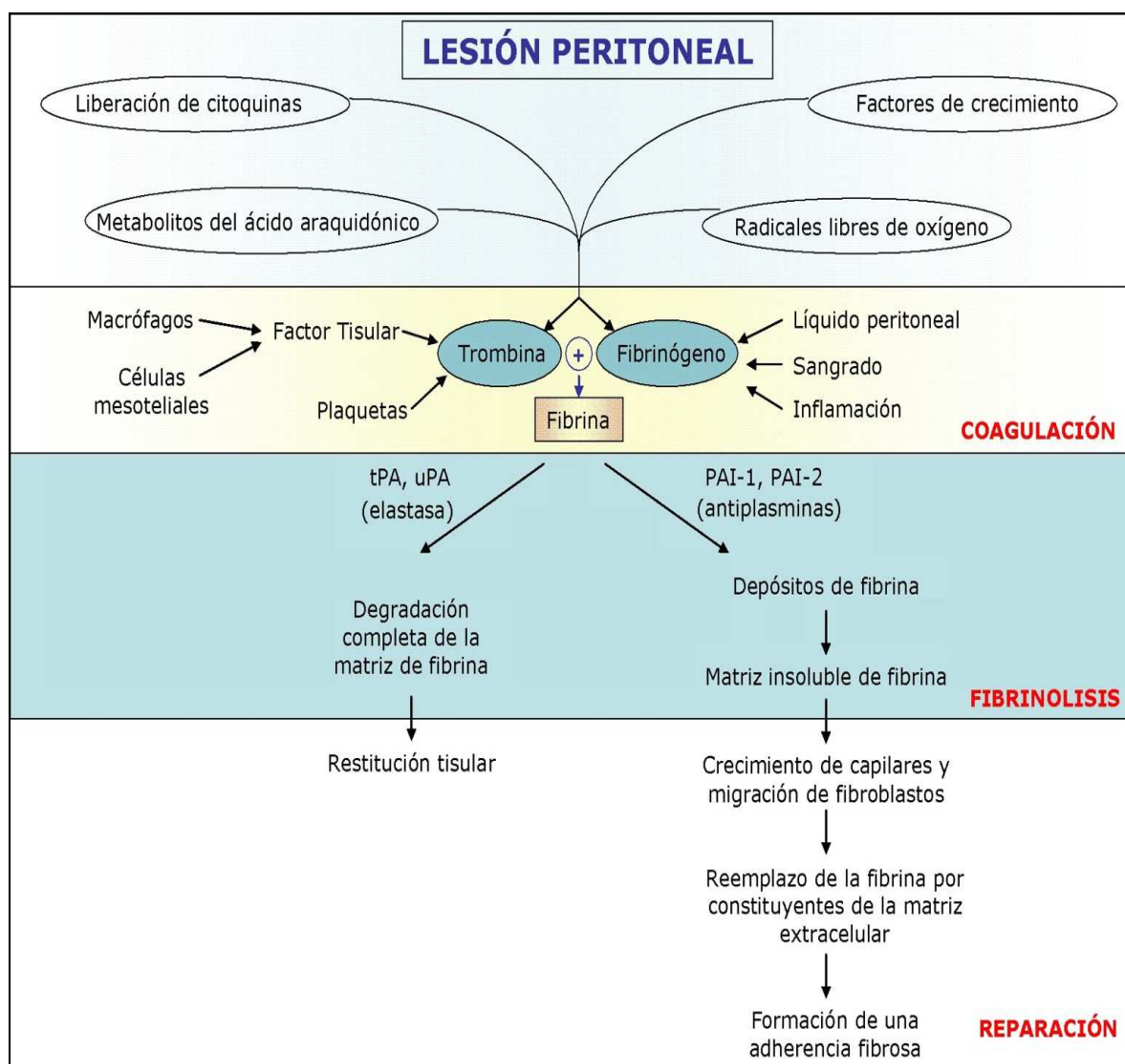


Figura 2: Esquema de los procesos biológicos que tienen lugar durante la reparación tisular peritoneal. La acción de las citocinas, junto con la cascada de la coagulación, componen la fase inflamatoria. El proceso de cicatrización comprende la degradación de la fibrina y la reparación tisular. Modificado de Holmdahl (1997).

Varios factores traumáticos como la cirugía, la isquemia, la presencia de cuerpos extraños o la infección local perturban el equilibrio entre la coagulación y la fibrinólisis en la cavidad abdominal. El coágulo de fibrina protege a las bacterias contra las defensas inmunológicas de la cavidad abdominal. Si la actividad fibrinolítica es adecuada, las adherencias fibrinosas serán lisadas. Cualquier desequilibrio entre la deposición de fibrina y su degradación es un factor determinante de la formación adherencial (Buckman y cols., 1976a). De manera que cuando la actividad fibrinolítica local se ve comprometida (falla o es insuficiente), el depósito de fibrina sufre un proceso de reparación tisular que se extiende a la red de fibrina. Entonces, la adherencia fibrinosa se organiza en una

adherencia fibrosa a través del crecimiento de capilares y la invasión de fibroblastos (figuras 2 y 3). Los fibroblastos reemplazarán la fibrina con otros componentes de la matriz extracelular, principalmente colágeno (Holmdahl, 1997).

La fibrina, soluble en un principio, se convierte en una matriz insoluble al entrar en contacto con ciertos factores de coagulación como el Factor XIIIa o con sustancias como la fibronectina. Entonces se considera que la adherencia es irreversible. El período crítico en el que la matriz de fibrina es lisada o se organiza se encuentra entre las 48-72 horas tras la agresión peritoneal (diZerega, 1997).

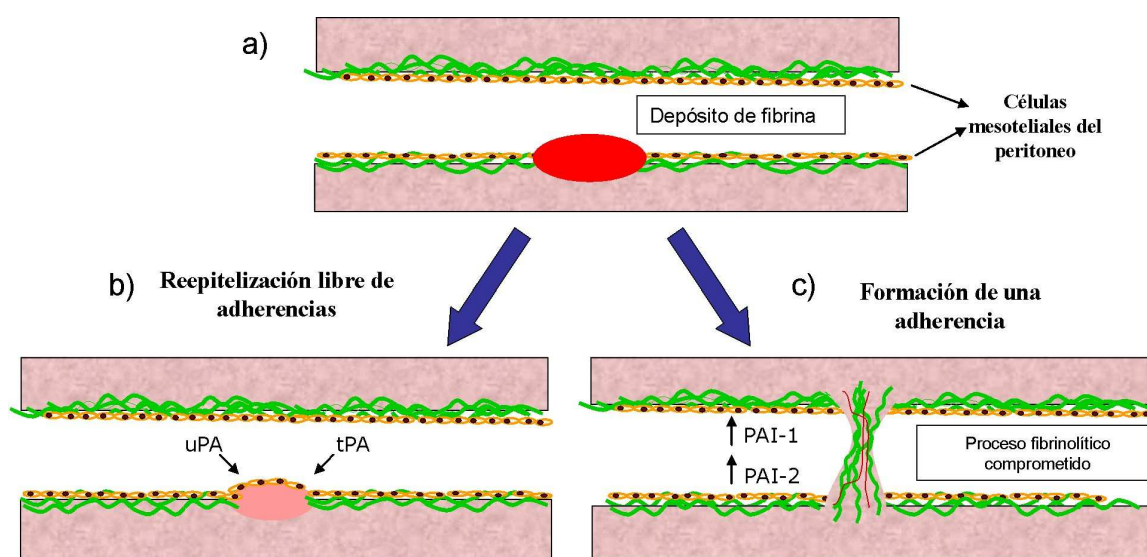


Figura 3: Esquema ilustrativo de la reparación tisular peritoneal y la formación adherencial. Se muestran las dos vías alternativas que pueden producirse tras la formación del coágulo de fibrina. (Modificado de Holmdahl e Ivarsson, 1999). (a) El coágulo de fibrina aparece en la zona de mesotelio dañado y representa el primer paso en el restablecimiento de la integridad tisular; (b) En condiciones normales, y gracias a la actuación de uPA y tPA durante el proceso fibrinolítico, el coágulo de fibrina se degrada a medida que la zona denudada es regenerada; (c) Por el contrario, en condiciones en que el proceso fibrinolítico se vea comprometido por el aumento de los inhibidores de los activadores del plasminógeno, PAI-1 y PAI-2, la degradación del coágulo de fibrina se verá retardada y las células regenerantes quedarán atrapadas en la malla de fibrina dando lugar a la formación de una adherencia fibrinosa que, si no es degradada en un corto espacio de tiempo, quedará establecida como una adherencia permanente.

1.4.1.1 EL SISTEMA FIBRINOLÍTICO

El sistema fibrinolítico consiste en el lisado de la fibrina en sus productos de degradación a través de la acción de una enzima denominada plasmina. La formación de plasmina constituye una importante fuente de actividad proteolítica localizada que puede ser interesante no sólo en la fibrinólisis, sino también en una gran variedad de funciones

celulares, incluidas aquellas mediadas por la activación del LAP-TGF β . El TGF- β en su forma activa no sólo interacciona con el sistema fibrinolítico y la matriz extracelular, sino también con muchos otros mediadores celulares involucrados en el proceso de formación adherencial.

La plasmina no existe como tal, y necesita ser activada a partir de un sustrato inactivo que se encuentra disponible en grandes cantidades, el plasminógeno (**figura 4**). La activación es llevada a cabo mediante la acción enzimática del **activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA)** o del **activador tisular del plasminógeno (tPA)**. Pequeñas cantidades de estos factores son suficientes para la producción de grandes cantidades de plasmina (Scott-Coombes y cols., 1995). La recuperación de la actividad de los activadores del plasminógeno alrededor de 3 días post-cirugía conduce a la lisis de fibrina y la cicatrización del tejido libre de adherencias (Thompson y Whawell, 1995).

El **tPA**, producido principalmente en el endotelio vascular, es el principal activador del plasminógeno presente en la sangre y aparece prácticamente en todos los tejidos (Risberg y cols., 1986; Thompson y cols., 1989, Whawell y cols., 1993a; Whawell y cols., 1993b; Wodzinski y cols., 1993). Tiene una gran afinidad por la fibrina y es el responsable del 95% de la activación del plasminógeno en la cavidad peritoneal, encontrándose menos involucrado en la activación de la fibrinólisis sistémica (Collen y Lijnen, 1991). También las células mesoteliales y los macrófagos producen tPA.

El **uPA** es producido por las mismas células y resulta igualmente efectivo en la degradación de la fibrina, aunque su menor afinidad por ésta da como resultado una capacidad activadora del plasminógeno muy inferior. Además de la activación del plasminógeno, el uPA puede desarrollar un importante papel en la remodelación tisular. El uPA es el principal activador del plasminógeno de la orina, y se encuentra presente en el plasma y en gran cantidad de tejidos.

El mecanismo de activación de plasminógeno a plasmina ocurre a través de la unión del uPA a un receptor específico de superficie celular (uPAR). La unión de tPA a un receptor de membrana no ha sido confirmada, pero diversos autores (Allan y Martin, 1995; Reuning y cols., 1998) afirman que el tPA podría ser el principal activador del plasminógeno involucrado en la liberación de la plasmina a partir del coágulo sanguíneo.

La actividad de tPA y uPA puede ser inhibida por la acción de los inhibidores de los activadores del plasminógeno PAI-1 y PAI-2, antagonistas con los que forman complejos inactivos de estequiometría 1:1.

El **PAI-1** es el principal inhibidor del tPA y del uPA, y es producido por una gran variedad de células que también pueden producir activadores del plasminógeno, entre las que se encuentran las células endoteliales, las células mesoteliales, los macrófagos y los fibroblastos.

El **PAI-2**, producido por células endoteliales, células mesoteliales, monocitos y fibroblastos es menos efectivo en contrarrestar a los activadores del plasminógeno. Encuentra, probablemente, una mayor relevancia en la reparación tisular peritoneal.

En conclusión, la reducción en la actividad de los activadores del plasminógeno podría venir causada por la disminución en los niveles de tPA, y/o uPA, el aumento en la expresión de PAI-1, y/o PAI-2, o ambos. Después de la disminución de la actividad de los PAI, el peritoneo regenerado ha demostrado, experimentalmente, tener actividad fibrinolítica aumentada (Raftery, 1979).

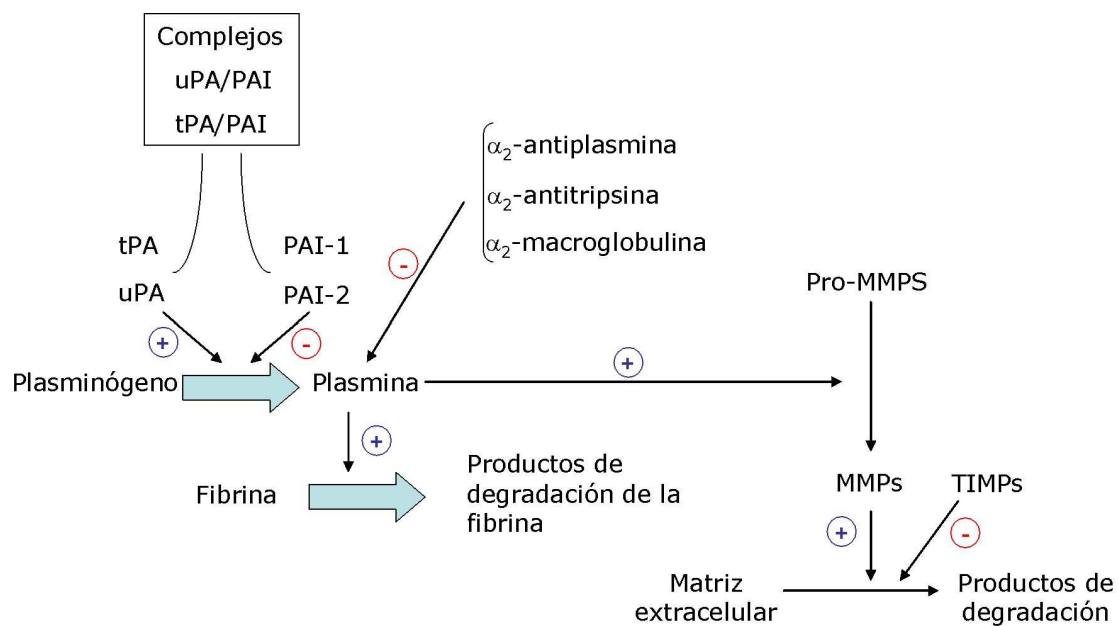


Figura 4: El sistema fibrinolítico (Tomado de Holmdahl, 1997)

Existen, además, proteínas plasmáticas que actúan como inhibidores de la actividad de la plasmina: la α_2 -macroglobulina, la α_2 -antitripsina y la α_2 -antiplasmina, aunque su papel en la reparación tisular no está totalmente claro (Harada y cols., 1987).

El trauma producido en la membrana mesotelial tiene un efecto diferente sobre el sistema fibrinolítico en el peritoneo y en el líquido peritoneal.

En el **tejido peritoneal lesionado**, se encuentra un aumento en los niveles de PAI-1 y una disminución en los de tPA del tejido adherencial y del tejido peritoneal de pacientes con adherencias, que conducen a una disminución de la actividad fibrinolítica.

En el **líquido peritoneal**, la actividad fibrinolítica se ve disminuída, principalmente, por el aumento en los niveles de PAI-1. Por lo tanto, los factores activadores del plasminógeno (tPA y uPA) y el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) responsables de la fibrinólisis juegan un importante papel en la patogénesis de las adherencias (Ivarsson y cols., 2001). En caso de infección, se observa una disminución en la actividad peritoneal de tPA, con la consiguiente disminución en el proceso fibrinolítico.

La importancia del sistema fibrinolítico en el proceso de formación adherencial no queda relegada a la actividad degradativa de fibrina que presenta la plasmina, sino que también existen interacciones entre el sistema fibrinolítico y otras proteinasas. En particular, las metaloproteinasas (MMP) y sus inhibidores, los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP). Estas dos tipos de moléculas son importantes en la remodelación de la matriz extracelular y por ello resultan determinantes en el desarrollo de la adherencia.

Los genes que codifican las MMP pueden ser inducidos por sustancias como las citocinas. La manipulación quirúrgica que resulta en formación adherencial altera tanto el equilibrio entre PA y PAI como el equilibrio entre MMP y TIMP en el líquido peritoneal. Se ha encontrado una estrecha relación entre el sistema de la fibrinólisis y la activación de las MMPs. El uPA y la plasmina participan en la activación de pro-MMP-1, pro-MMP2, pro-MMP-3 y pro-MMP-9 (Mazzieri y cols., 1997; Lijnen y Collen, 1999).

Las **MMP** son endopeptidasas que dependen de zinc para realizar su acción catalítica. Son secretadas como proenzimas que deben ser activadas para ejercer su acción biológica. La plasmina es capaz de activar la forma latente. Hasta la fecha, se han descrito al menos 25 MMP diferentes (Bohórquez-Sierra, 2006). La familia de las MMPs es capaz, en general, de degradar todos los componentes de la matriz extracelular (fibrinógeno, fibronectina, gelatina, elastina, colágeno, caseína y proteoglicanos). Entre sus actividades biológicas se encuentran la migración y proliferación celular, la angiogénesis y la

remodelación tisular, además de ser capaces de activar otras MMP. Participan en procesos reproductivos como la menstruación, la ovulación y en la involución uterina, mamaria y prostática, y juegan un importante papel en los procesos inflamatorios.

Entre ellas, cinco grupos de MMP tienen un papel reconocido en la cicatrización de heridas:

- a) Las **colagenasas**. A este grupo pertenecen la MMP-1 o colagenasa intersticial, producida por fibroblastos, células endoteliales y células mesoteliales; la MMP-8 o colagenasa de neutrófilo y la MMP-13. Degradan de manera preferente los colágenos fibrilares tipo I, II y III. La MMP-13 tiene como sustrato al PAI-2.
- b) Las **gelatinasas**. A este grupo pertenecen la MMP-2 o gelatinasa A y la MMP-9 o gelatinasa B. Son producidas, entre otras, por las células mesoteliales.
- c) Las **estromelisin**as. A este grupo pertenecen las MMP-3, -10, -11 y la MMP-7, también denominada matrilisina.
- d) Las **metaloproteinasas de membrana**. A este grupo pertenecen las MMP-14, -15, -16 y -17. También denominadas MT-MMP-1, -2, -3 y -4, respectivamente.
- e) **Otras metaloproteinasas de matriz**. En este grupo se encuentra la MMP-12 (metaloelastasa de los macrófagos), que no puede incluirse en ninguno de los grupos anteriores.

Hasta el momento, se han caracterizado cuatro **TIMP** (TIMP-1, -2, -3 y -4), cuyas acciones son opuestas a las de las MMP. Las concentraciones relativas de MMP y TIMP y la actividad proteolítica resultante son importantes en muchas situaciones normales y patológicas. La expresión aberrante de MMP y TIMP se ha asociado con complicaciones ginecológicas como la endometriosis y la formación adherencial (Ma y cols., 1999).

La reducción de la formación adherencial ha sido relacionada con la disminución en la actividad de PA y MMP y el aumento de la actividad de PAI y TIMP en el líquido peritoneal (Sharpe-Timms y cols., 1998). Por ello, las sustancias capaces de modular el balance de los sistemas PA/PAI y MMP/TIMP se presentan como un posible mecanismo para la reducción de la formación adherencial postquirúrgica.

1.4.2 LA CÉLULA MESOTELIAL

El **mesotelio** es una monocapa de células mesoteliales que reviste tanto la cavidad peritoneal como el resto de las cavidades serosas (pleural y pericárdica). Procede embriológicamente del mesodermo y consiste en un epitelio uniestratificado plano en el que las células mesoteliales se encuentran ancladas a una membrana basal.

Bajo ella, subyace la capa subserosa o submesotelial, consistente en una matriz extracelular formada por diferentes tipos de colágeno, glicoproteínas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, y estructuras vasculares y linfáticas.

Dependiendo de su localización, las fibras colágenas que forman parte de la capa submesotelial se disponen de forma distinta. En las zonas no lagunares del mesotelio se organizan en una fina capa continua de grosor uniforme, mientras que el colágeno que bordea la zona lagunar se organiza en forma de grandes haces individuales. Entre estos haces y la cubierta mesotelial hay una fina y discontinua capa de fibras elásticas. Entre los haces de fibras colágenas, el mesotelio, a menudo, se encuentra en íntimo contacto con el endotelio linfático subyacente. En estas áreas de íntimo contacto es donde se localiza el estroma (*stomata*).

La difusión y reabsorción de fluidos ocurre libremente a través del mesotelio y del estroma submesotelial. Gracias a ello, el deslizamiento de los órganos internos se realiza con facilidad, impidiendo así la formación de adherencias conjuntivas entre los órganos de las cavidades abdominal y torácica. Sin embargo, las células mesoteliales se encuentran ancladas a la membrana basal a través de uniones muy laxas, de manera que pueden ser fácilmente separadas de esta membrana debido al más mínimo trauma. Cualquier tipo de lesión es capaz de provocar el cambio morfológico de las células mesoteliales (Dobbie, 1989; Breborowicz y cols., 1991). Esto es lo que ocurre durante un procedimiento quirúrgico en el que se produce una agresión a la integridad del mesotelio. Así, quedaría el submesotelio expuesto, pudiendo llegar a ser un núcleo incipiente para la formación de una adherencia.

Las **células mesoteliales** presentan características tanto de célula mesenquimal como de célula epitelial (Whitaker y cols., 1982). Con las células epiteliales comparten la forma poligonal y la presencia de filamentos intermedios de citoqueratina (citoqueratina 6, 8, 18 y 19) (Czernobilsky y cols., 1985), además de la capacidad de secreción de una

membrana basal, mientras que expresan filamentos típicos de célula mesenquimal como la vimentina y la desmina, además de la α -actina de músculo liso tras su estimulación.

En cuanto a sus características morfológicas, las células mesoteliales son planas y presentan una forma poligonal con bordes irregulares. Poseen microvellosidades y su núcleo es grande y prominente, por lo que estas células presentan un engrosamiento en esa zona (Pötzsch y cols., 1990). En cultivo, en los momentos iniciales, las células mesoteliales tienen una apariencia bipolar o multipolar de aspecto elongado, y una vez que llegan a confluencia, estas células adquieren una morfología poligonal característica de células epiteliales (Stylianou y cols., 1990). El diámetro inicial de estas células disminuye por una continua división celular hasta la formación de una monocapa característica distribuida en empedrado compuesta por células de morfología poligonal (Bittinger y cols. 1999). Las células mesoteliales son capaces de seguir dividiéndose sin cambiar de morfología hasta el 4º o 6º subcultivo. Después comienzan a sufrir cambios morfológicos, convirtiéndose en células gigantes multinucleadas (van Hinsbergh y cols., 1990).

En cuanto a sus características funcionales, las células mesoteliales secretan interleucina (IL)-1, -6 y -8, factor de necrosis tumoral (TNF- α), ácido hialurónico, prostaglandinas y factor de crecimiento transformante β (TGF- β) cuando son estimuladas *in vitro*, además de otras citocinas quimiotácticas como la proteína quimiotáctica de monocitos-1 y una citocina de la superfamilia de la IL-8 denominada RANTES (Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and presumably Secreted) para crear un gradiente químico que produzca la llegada de más células inflamatorias.

Las células mesoteliales contribuyen al proceso fibrinolítico mediante la secreción del activador del plasminógeno tisular (tPA) y de inhibidores de los activadores del plasminógeno (PAI). A través de este mecanismo y de la expresión de moléculas de adhesión celular (como la ICAM-1 y la VCAM-1), desempeñan un papel fundamental en la formación adherencial. La expresión de estas moléculas favorece la adhesión de neutrófilos y monocitos al mesotelio.

Las **moléculas de adhesión celular** (CAM) son proteínas clave en la respuesta inflamatoria. Son receptores transmembrana formados por tres dominios: un dominio intracelular que interacciona con el citoesqueleto, un dominio transmembrana y un dominio extracelular que interactúa con otras proteínas de adhesión celular o con la

matriz extracelular. La mayoría de las CAM pertenecen a cuatro familias de proteínas, que son: las integrinas, las selectinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas y las caderinas.

Las integrinas, las selectinas y los receptores de adhesión de la familia de las inmunoglobulinas (Ig) son expresados de manera selectiva por las células tisulares y pueden colaborar en las diferentes etapas de la llegada leucocitaria y la migración hasta el foco de la inflamación (Halme y cols., 1994; Wang y cols., 2007).

Las **integrinas** interaccionan con las proteínas a través de la secuencia Arg-Gly-Asp, que funciona como lugar de unión en muchas proteínas y células incluyendo la fibronectina, la laminina, el receptor de glicoproteína IIb/IIIa, las plaquetas y los leucocitos. Varios tipos celulares expresan estos receptores de adhesión. La activación del receptor integrina tiene profundos efectos en la expresión génica de las metaloproteinasas (MMPs) y varias citocinas. Las integrinas pueden, por tanto, favorecer el proceso de formación adherencial a través de: la activación de la agregación plaquetaria, el proceso de coagulación, la deposición de fibrina, la aceleración del proceso inflamatorio y la unión de las células mesoteliales a la fibrina y la matriz extracelular.

Las **selectinas** median el primer paso en la adhesión de los leucocitos al endotelio de las vénulas en los sitios de inflamación o daño tisular.

Entre los miembros de la **superfamilia de las inmunoglobulinas** se incluyen receptores de antígenos en la superficie celular, correceptores y moléculas de coestimulación del sistema inmunitario, moléculas implicadas en la presentación de antígeno a los linfocitos, moléculas de adhesión celular y ciertos receptores de citocinas.

Las **caderinas** son moléculas de adhesión celular dependientes de calcio. Son importantes durante el desarrollo embriogénico, la formación de las capas epiteliales de la piel y el intestino y en la formación axonal del sistema nervioso. Son fundamentales en la organización de la arquitectura de la capa epitelial y mantenimiento de su integridad. Cuando esta integridad se ve perturbada durante un procedimiento quirúrgico, se lleva a cabo la reepitelización del área dañada.

Lo que no queda claro hasta la fecha es la naturaleza y el origen de las células mesoteliales responsables de la reepitelización peritoneal y, por tanto, de las células que podrían constituir el tejido adherencial. Existen numerosas hipótesis que indican distintas fuentes:

- a) maduración de células madre mesenquimales
- b) células procedentes del peritoneo normal adyacente
- c) células mesoteliales circulantes en el líquido peritoneal
- d) células peritoneales transformadas
- e) metaplasia de células del tejido conectivo subperitoneal

Se ha comprobado que las **células mesenquimales primitivas con potencial pluripotente** identificadas en la superficie dañada en los estadios más tempranos de la cicatrización son capaces de diferenciarse en células mesoteliales. Se ha sugerido la localización de estas células en la subserosa y que podrían ser capaces de diferenciarse a miofibroblastos y células de músculo liso, aunque algunos autores cuestionan el papel de estas células en la regeneración mesotelial (Whitaker y Papadimitriou, 1985; Mutsaers y cols., 2000). Lucas y cols. (1996b) demostraron que al trasplantar células madre mesenquimales en la cavidad abdominal de ratas entre 4 y 5 horas después de haber retirado una sección del peritoneo, se producía un aumento en la formación de adherencias postquirúrgicas. Sin embargo, cuando las células fueron trasplantadas inmediatamente después de la cirugía, se encontraba una reducción significativa en la formación adherencial, siendo inexistente en la mitad de los animales. Estos resultados sugieren que las células madre mesenquimales contribuyen a la remesotelización, así como a la formación adherencial una vez que ya se han establecido los puentes de fibrina entre las dos superficies dañadas. Para ellos, aunque no hay evidencia directa de que las células mesenquimales se diferencian en células mesoteliales, la implicación es clara. Se ha argumentado (Raftery, 1973) que en condiciones de isquemia las células mesenquimales pueden no proliferar y, por tanto, no aparecerían las células mesoteliales en estas condiciones, o lo harían más lentamente, por lo que el mesotelio no sería capaz de regenerarse antes de que se formaran las adherencias.

Existen autores (Ellis y cols., 1965; Mutsaers y cols., 2000) que, por el contrario, defienden que el mesotelio en regeneración se origina a partir de la **población celular mesotelial adyacente no dañada**. La existencia de una gran cantidad de células en división en los bordes de la lesión apoya el papel de estas células en la regeneración del mesotelio dañado.

Sin embargo, otros autores (Ellis y cols., 1965; Foley-Comer y cols., 2002) sostienen que las **células mesoteliales libres** obtenidas mediante lavados peritoneales son la fuente celular implicada en la formación del nuevo mesotelio en todas las superficies serosas, mientras que cultivos de fibroblastos o macrófagos no se sitúan en áreas de serosa dañada, proliferan ni se incorporan en el mesotelio reconstituido.

Bittinger y cols. (1999) también mantienen que durante la reparación de grandes defectos peritoneales, son las células mesoteliales (además de las células multipotenciales de la subserosa) las que contribuyen a la regeneración de la superficie mesotelial antiadhesiva, aunque en este estudio las células mesoteliales eran procedentes de omentum humano y no células libres. Sugerían además un cambio fenotípico de las células mesoteliales para facilitar su implicación durante la reparación peritoneal. También Asano y cols. (2005) obtuvieron resultados satisfactorios en la prevención adherencial, trasplantando una lámina de células mesoteliales autólogas en un modelo de hernia en rata.

Otra de las teorías propuestas es la **transformación a partir de macrófagos peritoneales** en células mesoteliales (Ryan y cols., 1973; Eskeland y Kjaerheim, 1996).

No faltan tampoco autores, como Saed y cols. (2001), que defiendan que son los **fibroblastos** peritoneales procedentes **del tejido conectivo subperitoneal** los responsables del desarrollo adherencial. Las citocinas, así como las condiciones de hipoxia presentes en la zona dañada, podrían hacer que los fibroblastos peritoneales adquiriesen un fenotipo que favoreciera la formación de tejido adherencial. Este cambio podría ser inducido por variaciones en el patrón de expresión de varios genes durante el proceso de formación de adherencias.

Así, no existe un consenso en cuanto a la naturaleza de las células reparadoras del mesotelio. Lo que sí parece obvio es que las células que quedan atrapadas en la matriz de fibrina en situaciones con actividad fibrinolítica comprometida y dan lugar a las adherencias son las mismas que llevan a cabo la regeneración mesotelial en condiciones normales sin alteraciones en el proceso fibrinolítico.

A pesar de las numerosas investigaciones en cuanto a la naturaleza y formación de adherencias peritoneales, se echan en falta estudios sobre cultivos celulares obtenidos a partir de este tejido que desvelen el fenotipo y comportamiento de las células que las

componen, de tal manera que nos permita tener una idea sobre su naturaleza y función. Por eso, éste será uno de los objetivos de la presente tesis doctoral.

1.4.3 CÉLULAS MEDIADORAS DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA

Está claro que la reducción en la actividad fibrinolítica peritoneal representa el mecanismo patogenético en la etiología de la formación adherencial. Sin embargo, parece ser que las alteraciones en las funciones de los macrófagos se encuentran relacionadas con la fisiopatología de la formación adherencial. Así, las adherencias parecen ser el resultado de un proceso inflamatorio.

La agresión quirúrgica del peritoneo da lugar a la liberación de sustancias como la histamina y las quininas vasoactivas, que promueven un incremento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Así, se produce un exudado fibrinoso y proteináceo que se coagula en unas 3 horas, cubriendo el área dañada y que será infiltrado por células inflamatorias como los leucocitos peritoneales y los macrófagos. En respuesta a la agresión inicial, estas células, junto con las células mesoteliales, producen mediadores celulares que servirán para modular y orquestar la respuesta de otras células involucradas en la respuesta inflamatoria.

El peritoneo se encuentra en contacto permanente con el líquido peritoneal, que facilita la función normal de los órganos que se encuentran en la cavidad peritoneal y es continuo, a través del sistema linfático, con el líquido pleural de la cavidad torácica y el sistema vascular. Así, las moléculas pueden entrar o salir de la cavidad peritoneal mediante transudación, exudación y transporte facilitado o vía sistema linfático. Los mediadores celulares producidos por macrófagos y células mesoteliales en el líquido peritoneal tienen un papel activo en la curación del peritoneo. Debido a su movilidad, el líquido peritoneal puede potencialmente modular la respuesta inflamatoria en una gran superficie.

La cinética de la infiltración celular en respuesta a la inflamación ocurre de la siguiente manera: las primeras células en aparecer en el peritoneo dañado son principalmente los **polimorfonucleares neutrófilos**, que permanecen durante uno o dos días y llegan atraídos por las quimiocinas derivadas de células mesoteliales e inflamatorias, como la IL-8, la MCP-1 y la IL-1. Sin embargo, los mediadores y las células atraídas hasta

la lesión no sólo colaboran en el proceso cicatricial, sino que también podrían ser responsables de la formación adherencial. Aunque la coincidencia del flujo de neutrófilos intraabdominales presente tras una lesión y la formación adherencial no aporta ninguna prueba consistente del papel de los neutrófilos en este proceso, Vural y cols. (1999) mostraron que la neutropenia disminuía el grado de formación de adherencias postoperatorias, demostrando su importancia en la cascada dinámica de la formación adherencial.

Los neutrófilos liberan los componentes de sus gránulos tóxicos en los tejidos circundantes durante la ingestión de partículas extrañas o microorganismos. Estos procesos pueden causar un daño mayor en los tejidos comprometidos. La inhibición efectiva del daño tisular se ha conseguido mediante la neutralización de las sustancias quimioatrayentes de neutrófilos (Zagorski y Wahl, 1997), el bloqueo de sus moléculas de adhesión (Andreoli y cols., 1994; Walzog y cols., 1999) y la eliminación o neutralización de las especies de oxígeno reactivas (Shandall y cols., 1986).

Los neutrófilos actúan, generalmente, produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS), especialmente radicales superóxido. La generación de peróxido de hidrógeno, de manera directa o indirecta a través del superóxido, media la reacción inflamatoria postoperatoria, ya que puede actuar como segundo mensajero aumentando la expresión de moléculas de adhesión celular e incrementando de manera transitoria la permeabilidad de la barrera endotelial.

Los neutrófilos también utilizan otras herramientas como es la enzima mieloperoxidasa para generar ácido hipocloroso. Lo que podría explicar, en un futuro, el mecanismo por el cual los neutrófilos resultan de importancia en la formación de las adherencias postoperatorias.

Otro radical libre extremadamente inestable, y por tanto reactivo, es el radical hidroxilo. El manitol es un reconocido agente neutralizador del radical hidroxilo. Ha sido empleado en un modelo de adherencias en rata, sin mostrar una reducción en la formación de éstas (ten Raa y cols., 2006).

De la misma manera que se ha observado apoptosis inducida por ROS en células mesoteliales, también se han detectado efectos citotóxicos. Estos mecanismos generan un daño adicional a la cubierta mesotelial, extendiéndose más allá de la propia zona lesionada y favoreciendo la posibilidad de la formación de adherencias. Además las ROS

inhiben la fibrinólisis aumentando la liberación de PAI-1 por parte de las células mesoteliales.

La eliminación de ROS por parte de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa reducen de forma significativa la formación adherencial (Yuzbasioglu y cols., 2008; Fletcher y cols., 2008).

Seguidamente llegan los **monocitos**, debido a las concentraciones elevadas de citocinas proinflamatorias como la IL-1, IL-6, IL-8 y el TNF- α en el líquido peritoneal. Más tarde se diferenciarán en macrófagos y se adherirán a la superficie de la herida (Liberek y cols., 2004). Tras el quinto día, el tipo celular predominante en el líquido peritoneal es el macrófago. La IL-1 y el TNF- α son dos citocinas proinflamatorias importantes en la fase más temprana de la curación y son producidas por macrófagos activados presentes en el líquido peritoneal. La IL-6 es expresada por macrófagos y su producción es aumentada por la IL-1 durante el proceso inflamatorio. También el TNF- α es un importante inductor de IL-6. Se sabe que el TNF- α , la IL-1 y la IL-6 interaccionan con el sistema fibrinolítico (Whawell y Thompson, 1995). La plasmina libera y moviliza al TNF- α , a la IL-1 y a la IL-6. El TNF- α y la IL-1 pueden disminuir la expresión de tPA tanto a nivel de la proteína como del mRNA (Tietze y cols., 1998), colaborando así en la regulación del proceso inflamatorio y posiblemente en la extensión y severidad de la formación y reformación adherencial. Los macrófagos contienen y secretan activador del plasminógeno; sin embargo, los macrófagos postquirúrgicos presentan niveles disminuidos de su actividad (Orita y cols., 1986a; Fukasawa y cols., 1989; Kuraoka y cols., 1992), volviendo a los niveles normales sobre el séptimo día tras la agresión peritoneal (Saksela y cols., 1985; Fukasawa y cols., 1989). Esta disminución en la actividad del activador del plasminógeno evitará la lisis de la adherencia fibrinosa que se organizará para formar una adherencia fibrosa permanente por la invasión de fibroblastos estimulados.

En los infiltrados macrofágicos se han encontrado también **linfocitos T** (Binnebösel y cols., 2008b). Varios estudios (Mavalia y cols., 1997; Kennedy y Karpus, 1999; De Winter y cols., 1999; Atamas y cols., 1999; Chiaramonte y cols., 1999; Gerard y Rollins, 2001; Lukacs y cols., 2001; Cunningham, 2001) han mostrado que los linfocitos T influyen de manera crítica en la organización de los primeros sucesos que conducen a

las diferentes respuestas tisulares inflamatorias, además de desarrollar la respuesta inmunitaria. Chung y cols. (2002) hipotetizaron que las células T y las citocinas y quimiocinas producidas por ellas eran mediadoras en la formación adherencial quirúrgica.

Los productos de secreción de los macrófagos tienen el potencial de modular la proliferación de los **fibroblastos** (Orita y cols., 1986b; Rodgers y diZerega, 1992) ya sea por estimulación (factor de crecimiento derivado de los macrófagos, IL-1, prostaglandina F2 y factor de crecimiento transformante β) o por inhibición (prostaglandina E2, inhibidor del crecimiento fibroblástico e interferón α) (Rodgers y diZerega, 1992). Pueden también suprimir (durante las 48 horas iniciales) y más tarde favorecer (48-54 horas) la proliferación de las células mesoteliales (Fukasawa y cols., 1988). Los macrófagos son críticos en la formación de la matriz de tejido conectivo y el sincitio mesotelial (Ryan y cols., 1973). Por lo tanto, estimulan la secreción de proteínas del tejido conectivo como la fibronectina, los proteoglicanos, el colágeno y las proteasas como la colagenasa y la elastasa. Además, los macrófagos residentes no quirúrgicos responden a la IL-1 secretando activador del plasminógeno, mientras que los macrófagos postquirúrgicos presentes en la cavidad abdominal transcurrido un día de la agresión muestran menor sensibilidad a la IL-1 (Kuraoka y cols., 1992).

Ar´Rajab y cols. (1995) demostraron que el aumento en el número de macrófagos peritoneales reduce el grado de formación adherencial intraperitoneal postoperatoria. Los macrófagos estimulados tienen elevados sus niveles de actividad del PA, lo que conduce a la fibrinólisis y por tanto a la disminución de las adherencias peritoneales. Lo que no pudieron demostrar Ar´Rajab y cols. (1995) fue si la cantidad neta de activador del plasminógeno venía aumentada por el incremento en el número de macrófagos peritoneales o si los macrófagos estimulados secretaban más PA.

Durante el tercer día después de la agresión, las células mesoteliales comienzan a cubrir a los macrófagos peritoneales de la superficie dañada, que quedan alojados en el interior de la herida. Los mensajeros quimiotácticos secretados por las plaquetas (TGF- β , VEGF, PDGF, FGFb, EGF, IGF-1 epinefrina y serotonina) así como las prostaglandinas y leucotrienos median la llegada de leucocitos al lugar de la herida (Rendu y Brohard-Bohn, 2001), lo que produce la atracción de las células mesoteliales, que son las células predominantes en la superficie peritoneal entre el cuarto y séptimo día tras la agresión.

Las células mesoteliales comienzan a proliferar sobre la superficie de la herida y forman múltiples isletas de células. La confluencia de estas isletas permite que la curación de heridas de gran superficie se realice con la misma velocidad que la curación de heridas de menor tamaño. Esta forma de curación contrasta con la de la piel, en la que el proceso de cicatrización tiene lugar desde el borde de la herida, de manera que lesiones mayores tardan más tiempo en curar que otras de menor tamaño.

El proceso continúa ya sea con la total cicatrización y/o con un proceso fibrótico, con la consiguiente deposición de matriz extracelular compuesta por fibronectina, ácido hialurónico, glicosaminoglicanos y proteoglicanos. Esta deposición es regulada por diversos factores de crecimiento y citocinas (TGF- β , EGF y VEGF) (Boland y Weigel, 2006). Desde la primera semana y hasta que transcurre un mes, la matriz se remodela y es reemplazada por proteínas como los colágenos al tiempo que se produce la revascularización.

1.5 MÉTODOS DE PREVENCIÓN

En la búsqueda de métodos efectivos en la prevención y/o disminución de la formación adherencial postoperatoria se han empleado una serie de técnicas y sustancias. Las principales técnicas de prevención se refieren a una **mejora en las técnicas quirúrgicas**, limitando el trauma en las estructuras intraabdominales; **la aplicación de adyuvantes** que intervengan en el balance entre la formación y degradación de la fibrina; y **el uso de barreras** que eviten el contacto entre las superficies dañadas, impidiendo así que se formen adherencias.

Se han empleado muchos tipos de terapias preventivas, pero sólo unas pocas han sido aplicadas clínicamente, a pesar de haber mostrado buenos resultados experimentales. Los estudios experimentales en prevención adherencial difieren en sus diseños y métodos de evaluación, haciendo difícil la interpretación de los resultados y la comparación entre ellos. Además, muchos de estos análisis presentan una gran desviación estándar, lo que hace que la relevancia de los resultados con efectos moderados sea cuestionable (Tingstedt y cols., 2007). A esto hay que sumarle que la presencia de adherencias, incluso aunque sea muy acentuada, no se correlaciona necesariamente con la incidencia y severidad de los episodios sintomáticos posteriores. Se requieren tiempos de seguimiento más largos para determinar las implicaciones de la formación adherencial y la eficacia de las terapias

administradas. Por otro lado, la evidencia clínica sobre la eficacia de las terapias empleadas contra la formación adherencial es difícil de evaluar ya que las laparotomías realizadas para una segunda observación que permitan analizar la distribución e intensidad de la reacción peritoneal no son justificables desde el punto de vista ético y sólo están permitidas en ciertos procedimientos ginecológicos (Hamel, 2007). Este es el motivo por el cual los modelos adhesiogénicos animales representan una interesante herramienta de estudio.

A pesar de los indudables costes de los estudios centrados en los mecanismos moleculares de la formación adherencial, el coste económico requerido en segundas intervenciones o en complicaciones relacionadas con las adherencias justifica claramente cualquier inversión en los medios para su atenuación.

1.5.1 TÉCNICAS QUIRÚRGICAS: MINIMIZACIÓN DE LA LESIÓN

Ya que el factor desencadenante de la formación de adherencias postquirúrgicas es la lesión del peritoneo durante el procedimiento quirúrgico, la minimización de éste y la exclusión de los materiales de cuerpo extraño de la cavidad peritoneal podrían conducir a una menor formación adherencial.

A través de los años se ha planteado que una técnica quirúrgica depurada que incluya la manipulación cuidadosa y mínima de los tejidos, la hemostasia selectiva, el material de sutura adecuado para cada caso, un tiempo quirúrgico lo más breve posible y el empleo de gasas húmedas, cumple las medidas indicadas en la prevención de la formación de adherencias. A pesar de la recomendación sobre el empleo de gasas y compresas húmedas, también se encuentra una asociación entre estos elementos y la formación de adherencias (Ellis, 1990), debido al trauma local sufrido por la superficie peritoneal al secar, limpiar, aislar o realizar hemostasia.

Los principios del modelo de enseñanza de Halsted, como son el manejo cuidadoso de los tejidos y la hemostasis meticulosa, son necesarios para evitar la presencia de sangre libre en la cavidad abdominal y de tejidos isquémicos que proporcionen una fuente de fibrina y resulte, así, en la formación de adherencias. Otras medidas efectivas incluyen el manejo cuidadoso y delicado de las asas intestinales con el objetivo de reducir el trauma, manteniendo los tejidos irrigados y húmedos, y el uso de instrumentos atraumáticos, para reducir la probabilidad de lesión en la serosa. Se deben evitar las

grandes lesiones abdominales así como la disección innecesaria. Parece ser que los defectos peritoneales y el suelo pélvico deben dejarse abiertos, ya que reperitonealizan rápidamente y la anastomosis debe ser cubierta con omentum. El omentum debe ser también colocado bajo la incisión de la laparotomía, ya que conducirá a una reducción en la respuesta inflamatoria y en la deposición de fibrina.

A pesar de los avances realizados en las técnicas quirúrgicas y las medidas tomadas para reducir la formación adherencial, no se observa una disminución de la incidencia de las adherencias según los estudios SCAR-2 y SCAR-3 (Parker y cols., 2004; Parker y cols., 2005) realizados por el grupo de investigación quirúrgica y clínica en adherencias (The Surgical and Clinical Adhesions Research Group).

La **laparoscopia** es un procedimiento quirúrgico tanto diagnóstico como terapéutico para las adherencias peritoneales. La cirugía laparoscópica se presenta como una buena alternativa a la cirugía abierta, ya que el trauma tisular es menor, sobre todo la agresión traumática del peritoneo. Hay una menor exposición a la hipotermia, menor contacto con el talco de los guantes y menor probabilidad de isquemia intestinal transitoria al no necesitar la maniobra de evisceración que se practica en muchas de las laparotomías.

Pese a ello, algunos autores defienden que la laparoscopia no es la solución a la formación adherencial como muchos creían (Schäfer y cols., 1998), aunque su eficacia como procedimiento diagnóstico no tiene discusión. La técnica laparoscópica produce una elevada tasa adherencial, al inducir la lesión del peritoneo a través de la hipotermia y el resecamiento producido por la insuflación de dióxido de carbono en la cavidad abdominal (neumoperitoneo) (Binda y cols., 2006; Peng y cols., 2009) y mediante un efecto directo del dióxido de carbono sobre las células mesoteliales, ya que favorece la expresión del PAI-1 por parte de éstas (Bergström y cols., 2003).

La cirugía laparoscópica parece disminuir en cierto grado la formación adherencial *de novo* (adherencias de nueva formación en lugares donde no se habían formado previamente), pero no su reformación (formación adherencial en lugares donde ha habido adherencias previamente) (Diamond, 1991; Lundorff y cols., 1991). El tratamiento de una adherencia se complica por la elevada tasa de reformación de adherencias después de la adhesiolisis, independientemente del tipo de adhesiolisis llevado a cabo o del tipo de adherencias.

1.5.2 APLICACIÓN DE ADYUVANTES

La aplicación de adyuvantes puede dividirse en dos categorías: la **administración de fármacos que alteren la cascada inflamatoria** desencadenante de la formación adherencial y **la separación de las superficies serosas mediante barreras durante las primeras etapas de la reparación tisular**. A pesar de que algunas de estas estrategias han proporcionado resultados relativamente buenos, ninguna ha conseguido abolir totalmente la formación adherencial.

1.5.2.1 TERAPIA ADYUVANTE FARMACOLÓGICA

Los agentes farmacológicos pueden estar dirigidos contra varias causas y/o componentes del proceso inflamatorio (la infección, las endotoxinas, o la exudación) y/o contra el propio proceso de formación adherencial (coagulación, deposición de fibrina o proliferación y actividad fibroblástica). Antes de proceder al empleo de estos agentes adyuvantes deben tenerse en cuenta una serie de inconvenientes.

En primer lugar, las zonas isquémicas son vulnerables a la formación adherencial, pero se encuentran aisladas del torrente sanguíneo y, por tanto, de la administración farmacológica vía sistémica.

En segundo lugar, la membrana peritoneal posee un mecanismo de absorción extremadamente rápido, limitando la vida media y la eficacia de los agentes administrados intraperitonealmente.

Tercero, cualquier agente antiadherencial debe actuar de manera específica contra la formación adherencial y no contra el proceso de cicatrización normal. Esto presenta ciertas dificultades, ya que ambos procesos utilizan la misma cascada (exudación, coagulación, deposición de fibrina y actividad e índice de proliferación de fibroblastos).

Son diversas las **sustancias empleadas en la prevención de la formación adherencial**:

- **Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)**

Alteran el metabolismo del ácido araquidónico bloqueando la ciclooxigenasa. Así, inhiben la síntesis de prostaglandinas y tromboxano. Esto conduce a la disminución de la permeabilidad vascular, de la agregación plaquetaria y de la coagulación, y al aumento de la función macrofágica. Los

AINEs tienen un efecto antiinflamatorio, analgésico y antipirético. Modulan una serie de aspectos del proceso inflamatorio y son capaces de reducir la formación adherencial en algunos modelos animales (Aldemir y cols., 2004).

- Terapia con glucocorticoides y antihistamínicos

Atenúa la respuesta inflamatoria reduciendo la permeabilidad vascular y la liberación de citocinas y factores quimiotácticos. Los corticosteroides como la dexametasona, la hidrocortisona y la prednisolona se han utilizado solos o junto con antihistamínicos como la prometacina mediante administración intraperitoneal. Los antihistamínicos inhiben la proliferación fibroblástica. Los potenciales efectos secundarios, que comienzan con la inmunosupresión y la cicatrización retardada de heridas, indican que estas sustancias deben ser utilizadas con extrema precaución.

- Progesterona y estrógenos

La progesterona muestra una disminución en la formación adherencial en modelos animales tan sólo en casos de formación adherencial menor, mientras que no tiene ningún efecto en casos de trauma tisular quirúrgico mayor (Confinio y cols., 1988). En estudios con humanos se ha observado incluso un aumento en el número de adherencias con el empleo de acetato de medroxiprogesterona intramuscular o intraperitonealmente (Holtz y cols., 1983). Los estudios con animales tratados con agonistas de la hormona secretora de gonadotropina mostraron una menor formación adherencial con respecto a los animales no tratados, mostrando que los estrógenos promueven la formación adherencial (Schindler, 2004).

- Anticoagulantes

La irrigación isotónica con cristaloides que contienen heparán sulfato podrían reducir la formación adherencial intraabdominal a través de la inhibición de la coagulación de la fibrina. Sin embargo, este uso de la heparina se ha asociado con hemorragias y retardo del proceso cicatricial.

- Agentes proteolíticos

La degradación de la fibrina es una posibilidad razonable y teóricamente interesante para la prevención de las adherencias. El empleo de estreptocinasa, urocinasa y plasmina mostraron resultados experimentales prometedores

(Hellebrekers y cols., 2000). La estreptocinasa incluso producía una reducción en la formación adherencial (Sievers y Eckert, 1981), pero no llegó a utilizarse en clínica.

Los agentes fibrinolíticos pueden causar complicaciones hemorrágicas. Sin embargo, la administración de tPA recombinante es capaz de reducir la formación adherencial en modelos animales sin que se produzca un aumento de estas complicaciones (Doody y cols., 1989). En los modelos experimentales, la actividad del activador del plasminógeno se ve reducida en presencia de trauma mecánico o térmico, isquemia y factores inflamatorios, todos ellos relacionados con la formación adherencial. Yeo y cols. (2007) mostraron que la administración de agentes fibrinolíticos como el tPA resulta efectivo en la prevención de adherencias recurrentes en un modelo experimental en conejo, pero se necesitan más investigaciones que establezcan la seguridad y efectividad del tPA recombinante en humanos.

- Antibióticos

Los antibióticos de amplio espectro se usan comúnmente en la prevención de infecciones postoperatorias y de la formación adherencial. Sin embargo, su administración a través del líquido de irrigación intraabdominal provoca la formación de adherencias y su uso no está no está recomendado como único agente en la prevención de adherencias (Sortini y cols., 2006).

- Sustancias neutralizadoras de radicales libres

Los estudios con sustancias neutralizadoras de radicales libres no han mostrado resultados convincentes a pesar de que, experimentalmente, se encontraron reducciones significativas en la formación adherencial. Las sustancias testadas incluyen el azul de metileno, el alopurinol, la vitamina E, la SOD, la catalasa y el manitol (Rijhwani y cols., 1995; Kluger y cols., 2000; De la Portilla y cols., 2004; ten Raa y cols., 2006). No existen datos de estudios clínicos.

- Intervención en la reparación fibrosa

La intervención en la formación de fibrosis es otro posible camino en la disminución del desarrollo adherencial. La pentoxifilina inhibe la síntesis de colágeno y glicosaminoglicanos, disminuyendo la fibrosis. Pero sus funciones son complejas. En un estudio de Chalkiadakis y cols. (1985), la pentoxifilina

disminuía la cantidad de adherencias, pero posiblemente a través de mecanismos ajenos a la disminución de la fibrosis. El TGF- β (sustancia profibrótica) disminuye la expresión de tPA y aumenta la de PAI-1 (Ghellai y cols., 2000). El empleo de anticuerpos anti-TGF y de inhibidores del enzima convertidor de la angiotensina (que disminuyen el TGF- β) produce la reducción de la formación adherencial (Bulbulla y cols., 2005). La relación entre el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) y la fibrosis y la angiogénesis hacen de este factor de crecimiento un futuro objetivo potencial en la prevención de adherencias (Thaler y cols., 2005).

- Inhibidores de la angiogénesis

La expresión del marcador vascular CD105 en adherencias humanas, indicando la presencia de vasos sanguíneos más inmaduros y la presencia del factor de crecimiento vascular A, sugieren que el uso de inhibidores de la angiogénesis podría resultar eficaz en la prevención adherencial (Epstein y cols., 2006).

1.5.2.2 TERAPIA ADYUVANTE DE BARRERA

Las barreras empleadas en la prevención adherencial pueden dividirse en dos categorías principales: las **soluciones macromoleculares** (hidroflotación) y los **dispositivos mecánicos**. En los últimos años, ambos tipos de barreras han demostrado un progreso real en la prevención de adherencias.

La barrera ideal, además de ser segura y efectiva, debería ser no inflamatoria, no inmunogénica, mantenerse en su lugar durante la fase crítica de remesotelización sin necesidad de suturas o grapas, permanecer activa en presencia de sangre y ser completamente biodegradable. Pero además no debe interferir con el proceso de cicatrización, promover la infección ni causar adherencias.

1.5.2.2.1 Soluciones macromoleculares

- Cristaloides

La absorción de agua y electrolitos en la cavidad peritoneal es rápida, siendo capaz de absorber 500 mL de una solución salina en menos de 24 horas. Dado que la remesotelización de las superficies peritoneales dura unos 5-8 días, una solución cristaloides debería ser bien absorbida antes de que se produjera la

deposición de fibrina y la formación adherencial fuera completa. Desde un punto de vista teórico, los cristaloides instilados peritonealmente no están diseñados para la prevención de la formación adherencial. El hecho de dejar grandes volúmenes de líquido en la cavidad peritoneal tras el procedimiento quirúrgico puede reducir la capacidad del paciente para eliminar la infección. El aumento en el volumen intraperitoneal facilita la acumulación de *Escherichia coli* ya que retarda su eliminación de la cavidad peritoneal y puede empeorar la recuperación del paciente tras la cirugía.

La mayoría de las soluciones cristaloides son acidóticas y por tanto pueden empeorar la acidosis tisular que se presenta durante la hipoperfusión de los tejidos ante cualquier agresión. Sin embargo, la solución de Ringer Lactato contiene 45 mEq/L de cloro menos que el suero fisiológico, causando sólo hipercloremia transitoria y disminuyendo la posibilidad de causar acidosis (Griffel y Kaufman, 1992). Y por ello, es de preferencia cuando debemos administrar cantidades masivas de soluciones cristaloides.

El Ringer lactato es seguro, no muy caro, accesible y presenta mejor capacidad tamponante que el suero salino en el que parte del sodio de la solución salina isotónica es reemplazada por calcio y potasio (Griffith, 1986). Aunque el Ringer Lactato podría prevenir la formación al evitar el contacto entre las superficies peritoneales dañadas además de colaborar en la eliminación del exudado de fibrina, la incapacidad de esta solución cristaloides para evitar la formación adherencial ha quedado demostrada en modelos animales (Bellón y cols., 2006). En el estudio de Fayez y Schneider (Fayez y Schneider, 1987), se mostraba una elevada tasa de formación de adherencias tras el uso de cristaloides.

Además, la presencia de cristaloides en la cavidad abdominal diluye las opsoninas y ocasiona, por tanto, una disminución de la opsonización (proceso por el que se marca a un patógeno para su ingestión y destrucción por un fagocito) y la fagocitosis, lo que se traduce en la clínica en un mayor índice de infección (diZerega y Campeau, 1994; DeCherney y diZerega, 1997).

- Polisacáridos

Dextrano-70

En la prevención adherencial es corriente el uso de una solución al 32% de dextrano-70. Debido a la hidroflotación de las estructuras abdominales cuando se aplica esta solución, se da una separación fisiológica entre las superficies peritoneales. Debido a la dilución que se produce, el dextrano disminuye la concentración local de fibrina, preserva los activadores locales del plasminógeno e interfiere con la expresión de moléculas de adhesión por parte de los neutrófilos.

Los dextrans poseen, además, una actividad antitrombótica por su acción sobre la hemostasia primaria (disminuyen la agregación plaquetaria) y sobre los factores de la coagulación (facilitan la lisis del trombo). Estas acciones aparecen a las 4-6 horas de su administración y perduran durante unas 24 horas. A pesar de ser una sustancia muy utilizada en la prevención adherencial, los resultados experimentales en cuanto a su eficacia y seguridad son contradictorios (Risberg, 1997; Ito y cols., 2007b; Parsak y cols., 2007). Produce efectos secundarios como son la efusión pleural, edema labial, anomalías en la función hepática y raramente coagulación intravascular diseminada.

Carboximetilcelulosa

Es un derivado de la celulosa. La carboximetilación de los grupos hidroxilo glucosídicos hace que el polímero sea hidrofílico. Está cargado negativamente a pH fisiológico y es soluble. Actúa manteniendo las superficies peritoneales lesionadas separadas y permitiendo la cicatrización independiente de éstas. Se han obtenido buenos resultados en estudios con membranas de carboximetilcelulosa/hialuronato en modelos adhesiogénicos (Sahin y cols., 2007), al igual que con derivados de la celulosa (Ito y cols., 2007a).

Icodextrina

La icodextrina es un polímero de glucosa derivado del almidón, que actúa como agente osmótico cuando se administra por vía intraperitoneal en diálisis peritoneal ambulatoria continua. Se usa como agente antiadherente, ya que permite la separación de las superficies lesionadas, en una solución al 4%. En un

estudio ginecológico laparoscópico, diZerega y cols. (diZerega y cols., 2002) mostraron que la incidencia de la formación adherencial disminuía del 52 al 32% con el uso de icodextrina al 4%. Por el contrario, existen investigaciones que demuestran la ineficacia de la icodextrina en la prevención adherencial (Bellón y cols., 2006; Caínzos y cols., 2007).

El ácido hialurónico y sus derivados

El ácido hialurónico (AH) es un polisacárido del grupo de los glucosaminoglucanos. Es un componente importante de la matriz extracelular del tejido conectivo, la piel, el cartílago, la sinovia y el humor vítreo. El AH es biocompatible, no inmunogénico, no tóxico y naturalmente bioabsorbible. Como la carboximetilcelulosa, está cargado negativamente a pH fisiológico y es soluble. El AH recubre las superficies serosas y proporciona un cierto grado de protección frente a las agresiones. Existen trabajos que apoyan la efectividad del ácido hialurónico administrado en forma de película (Sufiyarov, 2007) o en forma de gel (Shamiyeh, 2007). No obstante, el AH no es la sustancia más eficaz en la prevención adherencial (Nehéz y cols., 2005) e incluso hay autores que afirman que los geles de ácido hialurónico no reducen la formación adherencial (Sikkink y cols., 2006).

El ácido hialurónico ha sido combinado con tampón fosfato salino para formar una solución macromolecular que prevenga la formación adherencial, bajo el nombre de Sepracoat® (Genzyme, Cambridge, Mass., USA). Es aplicado de manera intraoperatoria previamente a la disección para proteger las superficies peritoneales de una lesión quirúrgica indirecta (como la abrasión, por ejemplo), más que para la separación de superficies lesionadas tras la operación. En modelos animales, esta solución reduce de manera efectiva el daño producido a la serosa, la inflamación y las adherencias postquirúrgicas. En estudios realizados en humanos esta solución disminuyó de manera significativa y segura la incidencia, magnitud y severidad de las adherencias (Ozmen y cols., 2002).

- **Fosfolípidos**

La adición de fosfolípidos puede recrear la capa lubricante dañada durante la cirugía. Los resultados experimentales obtenidos por Müller y cols. (Müller y

cols., 2001, Müller y cols., 2003) en estudios con fosfolípidos, principalmente con fosfatidilcolina, muestran su efectividad tanto en modelos con condiciones normales como con peritonitis. No se encontraron efectos negativos en la cicatrización de las heridas ni en la seguridad de la anastomosis. No obstante, en trabajos previos de nuestro grupo (Bellón y cols., 1996) se muestra la ineficacia de la fosfatidilcolina en la prevención de la formación adherencial.

- Selladores de fibrina

Los selladores de fibrina consisten principalmente en dos componentes: fibrinógeno y trombina, lo que les hace atractivos para su uso en la reducción de la formación adherencial. Además permiten la disminución del sangrado y aumentan la expresión de tPA y PAI-1 por parte de las células peritoneales humanas (Diamond y cols., 2004). Sin embargo, los resultados experimentales son discrepantes y no existen datos clínicos (De Virgilio y cols., 1999; Nur y cols., 2005; Peacock y cols., 2006).

1.5.2.2 Barreras continuas

Se ha empleado un gran número de barreras sintéticas o naturales con el objetivo de reducir la formación adherencial al ser colocadas sobre superficies traumatizadas. Como materiales naturales se han empleado el peritoneo, el omentum, ácido hialurónico, grasa, amnion o corion.

- Trasplantes peritoneales autólogos

Los estudios experimentales han demostrado que la cobertura de las lesiones del peritoneo parietal con trasplantes peritoneales autólogos aplicados microquirúrgicamente pueden prevenir completamente la formación adherencial severa (Asano y cols., 2007). Aunque el riesgo es superior con adherencias que involucran el peritoneo visceral, también en estos casos el trasplante peritoneal autólogo ha mostrado buenos resultados. El peritoneo visceral debería ser cubierto una vez finalizado el procedimiento quirúrgico, ya sea mediante un trasplante autólogo o una barrera sintética (Wallwiener y cols., 1998). La ventaja de la utilización de barreras sintéticas estriba en que no es necesario recurrir a la cirugía para la obtención del material, y éste puede ser cortado según el tamaño necesario antes de acceder al abdomen.

- Biomateriales

Como biomateriales compuestos por sustancias naturales se emplean: Surgisis®, formado por la matriz extracelular obtenida de la submucosa de intestino delgado del cerdo; Permacol®, colágeno porcino tratado con hexametildilsocianato (HMDI); AlloDerm®, colágeno acelular de procedencia humana (Bellón, 2008). Entre los biomateriales sintéticos empleados encontramos: Gelfilm® y Gelfoam® (Upjohn, Kalamazoo, Mich., USA); Surgicel® (Johnson & Johnson, New Brunswick, N. J., USA); Silastic® (Dow-Corning, Midland, Mich., USA); mallas de politetrafluoroetileno (PTFE, Gore-Tex®; Gore & Associates, Flagstaff, Ariz., USA); Interceed (TC7)®; celulosa regenerada oxidada (ORC; Johnson & Johnson); Seprafilm®, membrana bioabsorbible compuesta por hialuronato de sodio y carboximetilcelulosa (HA-CMC; Genzyme); Sepramesh® (Genzyme), compuesta por una prótesis reticular de polipropileno, cubierta por una cara por una lámina absorbible de hialuronato sódico; Parietex Composite® (Covidien, Mansfield, MA), formada por una prótesis reticular de poliéster y una lámina absorbible de colágeno recubierta por polietilenglicol/glicerol; PL-PU99 (diseñada por el grupo de Bellón JM (Bellón y cols., 2002), constituida por una prótesis reticular de polipropileno y una lámina no absorbible de poliuretano.

En general, la formación adherencial es un proceso complejo que depende de factores bioquímicos y biomecánicos. Un análisis exhaustivo multifactorial indica que la reducción de la incidencia y severidad de las adherencias peritoneales postoperatorias requiere de la minimización de la lesión tisular mediante una meticulosa técnica quirúrgica, el empleo de antibióticos adecuados que reduzcan la infección, y el empleo de agentes bioquímicos con o sin barreras biomecánicas. Sin embargo, pese al cumplimiento de todos estos requerimientos y a todas las investigaciones que se están llevando a cabo en el tema, la formación adherencial sigue siendo una complicación postquirúrgica frecuente y cuyo fin parece no estar cercano. Las técnicas de prevención de la formación adherencial realizadas hasta la fecha se han centrado en la modulación de la respuesta inflamatoria y en el empleo de biomateriales y soluciones de barrera, sin rendir resultados plenamente satisfactorios.

Parece clara, por tanto, la necesidad de la realización de investigaciones que se centren en otros factores diferentes a los comentados, como por ejemplo el origen y comportamiento de las células involucradas en la formación adherencial: su fenotipo, grado proliferativo y capacidad de diferenciación.

1.6 LA ANGIOGÉNESIS

El término angiogénesis se refiere al proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente. El proceso de la angiogénesis incluye la migración y proliferación de células endoteliales, la formación y organización de grupos celulares en estructuras tubulares que eventualmente se unirán para, finalmente, madurar en vasos sanguíneos estables.

La angiogénesis pasa por la destrucción local de la pared de vasos sanguíneos ya existentes y la activación de la proliferación y migración de las células endoteliales. No todas las células endoteliales reaccionan de la misma manera ante los estímulos angiogénicos, ya que, si así fuera, la zona de la red vascular afectada tendría que ser eliminada y el aporte de sangre a esta región del tejido se vería perturbado. Por eso, existe un mecanismo que permite la selección de ciertas células endoteliales en el interior de los capilares para la iniciación de la expansión angiogénica. Estas células, llamadas “*tip-cells*”, ocupan la posición predominante durante el crecimiento de nuevos vasos (Karamysheva, 2008). Reaccionan ante el gradiente de VEGF-A, el cual especifica la dirección de su migración, las conduce hasta la zona del capilar en crecimiento y les confiere un fenotipo invasor y migratorio. Así mismo, son capaces de activar proteasas, ya sea secretadas o unidas a la superficie celular, para la destrucción parcial de la membrana del basamento adyacente (Karamysheva, 2008). Estas células se disponen en estructuras tubulares alrededor de las cuales se forman las paredes de los vasos.

Durante la maduración de la red vascular, los capilares se fusionan para dar lugar a vasos de mayor tamaño. El proceso de maduración incluye una transición de un vaso en crecimiento hacia una red vascular completamente formada, quiescente y funcional. En esa situación, las *tip-cells* cambian de nuevo su comportamiento, ya que el contacto con otras células de su misma naturaleza o con capilares ya existentes provoca que dejen de moverse y que se establezcan interacciones intercelulares muy adhesivas en la zona de contacto (Karamysheva, 2008).

De manera simultánea, se forma el lumen del vaso (ya sea antes o después de entrar en contacto con otros capilares). El flujo sanguíneo emergente contribuye a la estabilización del nuevo vaso sanguíneo, mientras que el aporte de oxígeno debido al flujo sanguíneo disminuye la expresión local de VEGF-A y otros factores angiogénicos previamente inducidos por la situación de hipoxia.

Otro de los pasos claves en la maduración de los vasos sanguíneos es la incorporación de pericitos y células de músculo liso. Los pericitos y las células de músculo liso regulan la contracción y dilatación de los vasos sanguíneos, proporcionando resistencia y permitiendo la regulación de la perfusión de los vasos. Las paredes de los capilares y de los vasos más finos consisten en una monocapa compuesta por pericitos, mientras que las paredes de las venas o arterias están formadas por varias capas de células musculares lisas.

Los pericitos son células de origen mesenquimal y representan una población heterogénea de células susceptibles de diferenciación hacia diversos tipos celulares como son: células de músculo liso, fibroblastos u osteoblastos (Gerhardt y Betsholtz, 2003). Lo que no está claro es si los pericitos y las células de músculo liso son variantes fenotípicas de la misma línea celular o si son originadas a partir de progenitores diferentes. Los pericitos producen un efecto estabilizador en los vasos de reciente formación, deteniendo su crecimiento (Hirschi y cols., 1998; Sims, 2000; Gerhardt y Betsholtz, 2003).

La actividad tisular de la angiogénesis depende del balance de numerosos factores estimulantes o inhibidores. Se conoce un gran número de moléculas que actúan como reguladores positivos de la angiogénesis: los factores ácido y básico de crecimiento fibroblástico FGFa y FGFb, los factores de crecimiento transformantes TGF- α y TGF- β , el factor de crecimiento de hepatocitos HGF, el factor de necrosis tumoral TNF- α , la angiogenina, la interleucina-8, las angiopoietinas 1 y 2 (Yancopoulos y cols., 2000), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el VEGF derivado de la glándula endocrina (EGVEGF), la leptina, las prostaglandinas y los lípidos, que regulan en parte la expresión del VEGF (Dvorak, 2005).

Actualmente, se reconoce al sistema que incluye al factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y a sus receptores como los principales reguladores de la formación de vasos sanguíneos.

El TGF- β 1 también ha demostrado jugar un importante papel en este proceso, ya que, tras el contacto entre las células endoteliales y los progenitores de los pericitos, se produce una activación del TGF- β 1, que conduce a la inhibición de la proliferación y migración de las células endoteliales (Orlidge y D'Amore, 1987; Sato y cols., 1990), a la inhibición de la expresión del receptor VEGFR2 en estas células (Mandriota y cols., 1996), y a la diferenciación inducida de las células progenitoras a pericitos (Hirschi y cols., 1998). La incorporación de los pericitos y la acumulación de proteínas de la matriz extracelular en la membrana del basamento contribuyen a la maduración vascular y a su transición hasta el estado quiescente (Karamysheva, 2008).

En individuos adultos, la formación y crecimiento de nuevos vasos sanguíneos se encuentran estrictamente controlados. Estos procesos son activados sólo bajo condiciones muy concretas y definidas, como por ejemplo durante la cicatrización de heridas. La estricta regulación de este sistema y su equilibrado funcionamiento son muy importantes para el organismo, ya que una formación excesiva de vasos sanguíneos o un desarrollo insuficiente de éstos podría conducir a serias patologías.

Se pueden distinguir dos tipos de angiogénesis: la angiogénesis fisiológica/normal y la angiogénesis patológica/anormal (Martínez-Ezquerro y Herrera, 2006).

La **angiogénesis fisiológica** ocurre durante el crecimiento necesario de vasculatura que comienza en la embriogénesis y que continúa después del nacimiento en el desarrollo temprano postnatal, para proveer de manera adecuada el oxígeno y los nutrientes requeridos por los órganos en crecimiento (Ferrara, 2002), además de proporcionar señales promotoras morfológicas (Risau, 1997).

Por su parte, la **angiogénesis patológica** aparece cuando se alcanza y sobrepasa el umbral entre los estimuladores e inhibidores angiogénicos. Se pueden distinguir dos tipos de angiogénesis patológica: “angiogénesis activada” y “angiogénesis inhibida”, dependiendo de los niveles dominantes de moléculas pro- o anti-angiogénicas, respectivamente (Martínez-Ezquerro y Herrera, 2006). Cuando la angiogénesis es insuficiente, como en el caso de la enfermedad isquémica cardíaca o de preeclampsia, la “angiogénesis inhibida” está asociada al mal funcionamiento de las células endoteliales y a la regresión o malformación de los vasos, además de prevenir la revascularización, cicatrización y regeneración (Carmeliet, 2005).

La “angiogénesis activada” está relacionada con el desarrollo de tumores, que requieren de un aporte de oxígeno y nutrientes para el mantenimiento de su actividad. Está implicada en obesidad, asma, diabetes, cirrosis, esclerosis múltiple, endometriosis, SIDA, infecciones bacterianas, y enfermedades auto-inmunes (Ferrara y cols., 2003; Carmeliet, 2005), así como en procesos inflamatorios crónicos y la curación de las heridas, lo que sugiere su importancia en la formación adherencial.

1.7 LOS FACTORES DE CRECIMIENTO Y LAS CITOCINAS: SU PAPEL EN LA CURACIÓN PERITONEAL

La reparación tisular es uno de los procesos biológicos más complejos que ocurren a lo largo de la vida. Una vez que se ha producido una herida, múltiples mecanismos biológicos son activados inmediatamente para, de manera sincronizada, dar una respuesta al daño producido.

Los procesos de reparación tisular en la cavidad peritoneal vienen ampliamente influenciados por los factores de crecimiento, citocinas y receptores de éstas que se encuentran en el lugar del daño o que se hallan presentes en el fluido peritoneal. Aquellas sustancias expresadas en el lugar del daño podrán jugar un papel directo en la curación, mientras que aquellos presentes en el fluido peritoneal tomarán parte de manera más indirecta en la regulación de diferentes aspectos de los procesos reparativos tisulares. La regulación de estos procesos es muy compleja, ya que puede incluir desde la acción individual de cada una de estas sustancias hasta el efecto sinérgico de las interacciones entre más de 100 sustancias que a diferentes tiempos y/o a diferentes concentraciones pueden producir una gran variedad de propiedades en diferentes tipos celulares (Cromack y cols., 1990; Chegini y cols., 1994b), como pueden ser la inhibición o estimulación de la división celular, la estimulación del crecimiento por inducción de la diferenciación o la hipertrofia celular (Arnás y cols., 2002).

Entre las sustancias que comienzan la cascada de la curación/cicatrización encontramos a los miembros de la familia de los **factores de crecimiento (FC)**: el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor EGF ligador de heparina, el factor de crecimiento insulínico (IGF), los factores de crecimiento transformantes α y β (TGF- α y TGF- β), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento neurotrófico (NGF), la proteína 1

quimiotáctica para monocitos (MCP-1) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF). Entre estas sustancias, podemos encontrar también diferentes citocinas: las interleucinas, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), el factor neurotrófico ciliar, los interferones o los factores estimuladores de colonias de macrófagos y granulocitos (G-CSF y GM-CSF).

Los FC, junto con las hormonas y los neurotransmisores, desempeñan funciones de gran importancia en la comunicación intercelular. Se pueden definir como una especie de mediadores biológicos que promueven la proliferación celular, solos o en asociación (Higashiyama y cols., 1992). Un único FC puede dar lugar a importantes y diferentes respuestas, inhibitorias y/o estimuladoras, dependiendo de sus interacciones con otros factores y con el medio ambiente celular dentro del cual son liberados (Higashiyama y cols., 1992; Herndon y cols., 1993). Son capaces de desempeñar su función a muy baja concentración (del orden de los picogramos) en los líquidos corporales.

Las **citocinas** son proteínas secretadas producidas principalmente por linfocitos, macrófagos y precursores de células sanguíneas. Estas proteínas actúan regulando la función de los sistemas inmune y hematopoyético. Las citocinas comparten muchas propiedades con las hormonas y los FC. Median la comunicación entre las células y el sistema inmune a través de la unión a receptores específicos en las células diana. Las acciones biológicas de las citocinas varían ampliamente dependiendo del tipo de tejido sobre el que ejercen su efecto. Poseen propiedades antiproliferativas y regulan la síntesis de diferentes proteínas tras un proceso traumático, inflamatorio, de daño tisular o sepsis.

Los términos “factor de crecimiento” y “citocina” han sido empleados indistintamente por algunos autores. La diferencia entre un FC y una citocina radica en que ésta última representa un término neutral con respecto a su efecto sobre la proliferación celular, mientras que el FC implica un efecto positivo sobre la división celular. En este sentido, algunas citocinas pueden ser FC, como el G-CSF o el GM-CSF. Sin embargo, existen citocinas que poseen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento o la proliferación celular. De hecho, algunas de ellas como por ejemplo el ligando Fas (miembro de la familia del factor de necrosis tumoral) son capaces de producir muerte celular programada (apoptosis) en sus células diana.

Los FC y las citocinas son sintetizados y liberados por macrófagos activados que se encuentran en el líquido peritoneal y por diversos tipos celulares presentes en la zona de

la herida: neutrófilos, linfocitos, plaquetas y fibroblastos. Los FC liberados se unen a células diana por una vía específica a través de los receptores de superficie celulares, que transmiten la señal del exterior al interior de la célula, induciendo a las células a migrar, dividirse, o producir otros factores requeridos para la cicatrización de las heridas (Herndon y cols., 1993). Es decir, son proteínas que actúan sobre una o varias células diana induciendo una acción (ya sea la mitosis celular o la síntesis de la matriz). Los FC poseen también efectos sobre la locomoción, contractilidad y diferenciación celular, esenciales para la reparación de las heridas (Bennet y Schultz, 1993). Algunos de los FC son versátiles y promueven el crecimiento en una gran variedad de tipos celulares, mientras que otros pueden ser específicos para un tipo celular concreto. Una vez secretados los FC, se produce una compleja interrelación de procesos de retroalimentación en el medioambiente tisular, donde los FC se regulan a sí mismos, y los unos a los otros durante la reparación tisular o el proceso cicatricial (Herndon y cols., 1993). Estas propiedades demostrables *in vitro* llevaron a la conclusión de que los FC juegan un importante papel en la cicatrización de las heridas (Higashiyama y cols., 1992).

Los FC pueden actuar sobre la célula productora después de su secreción al medio extracelular (estimulación autocrina) o dentro de la célula de origen, con independencia de la secreción del FC al medio extracelular (estimulación intracrina), sobre células adyacentes (mecanismo paracrino) o sobre células distantes (mecanismo endocrino) (Bennet y Schultz, 1993). Una variación del mecanismo de estimulación paracrino es el modo yuxtacrino, en el cual el FC ejerce su efecto sobre la célula diana mientras permanece unido a la membrana celular de la célula productora (interacción intercelular).

Para que se produzca una reparación peritoneal normal, la disponibilidad de todas estas sustancias de señalización (FC y citocinas) debe ser óptima, precisa y sincronizada. La inhibición, interrupción o un exceso de su expresión puede producir un fallo en el proceso reparativo normal conduciendo ya sea a la no curación o a una excesiva formación tisular que puede desembocar en el desarrollo adherencial (Chegini, 1997).

Existen una gran cantidad de citocinas y quimiocinas implicadas en la iniciación, desarrollo y maduración de las adherencias abdominales tras una intervención quirúrgica.

1.7.1 EL FACTOR DE CRECIMIENTO DE ENDOTELIO VASCULAR

El factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) es, probablemente, uno de los factores de crecimiento más importantes en la formación adherencial.

Fue identificado en los años 80 como un factor de permeabilidad vascular (VPF) (Senger y cols., 1983; Connolly y cols., 1989) y como un factor de crecimiento específico de células endoteliales vasculares codificado por el gen VEGF, por lo que ha sido referido como VEGF, VEGF/VPF o, simplemente, VPF.

El VEGF es miembro de la súper familia de genes VEGF-PDGF que incluye al VEGF A, B, C, D y E, así como al factor de crecimiento placentario (PIGF) (Veikkola y cols., 2000; Shibuya, 2001; Dvorak, 2005). El VEGF-C y el VEGF-D favorecen la proliferación específica del endotelio de los vasos linfáticos (Cotran y cols., 2000), mientras que el resto de los miembros de la familia ejercen sus efectos, preferentemente, sobre las células endoteliales vasculares.

1.7.1.1 SÍNTESIS Y SECRECIÓN DEL VEGF

El gen que codifica para el VEGF humano consiste en ocho exones separados por siete intrones (Houck y cols., 1991; Tischer y cols., 1991). Los 26 primeros aminoácidos en el VEGF forman el péptido señal, que muestra que el VEGF es una proteína secretada. Inicialmente, se encontró que el procesamiento alternativo del RNA mensajero del gen del VEGF daba lugar a cuatro isoformas diferentes: VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆, que contienen, respectivamente, 121, 165, 189 y 206 aminoácidos tras la eliminación del péptido señal (Houck y cols., 1991; Tischer y cols., 1991). Existen otras isoformas menos frecuentes, el VEGF₁₄₅ y el VEGF₁₈₃ (Neufeld y cols., 1999). En células secretoras de VEGF, la isoforma más frecuente es la del VEGF₁₆₅, que es un homodímero con un peso molecular de 45 kDa (Ferrara y Henzel, 1989; Slavin, 1996).

Una característica importante de las isoformas del VEGF es su habilidad para unir heparina, lo que va a determinar que la proteína secretada sea acumulada en la matriz extracelular o que, por el contrario, sea liberada y por tanto accesible para su interacción con otras células (Karamysheva, 2008). Las isoformas VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆ unen heparina con alta afinidad y son acumuladas en la matriz extracelular prácticamente por completo. El VEGF₁₂₁ no une heparina, sino que es una proteína que difunde libremente, mientras

que la isoforma VEGF₁₆₅ muestra propiedades intermedias (es una molécula secretada que permanece unida a la superficie celular y a la matriz extracelular) (Houck y cols., 1992; Park y cols., 1993; Ferrara, 2001).

Las isoformas de VEGF asociadas a la matriz extracelular sirven de depósito de este factor que, cuando es requerido, se encuentra disponible para ser rápidamente liberado a través de la escisión por parte de la plasmina en la región C-terminal, con la consiguiente formación de un fragmento biológicamente activo (Houck y cols., 1992). En este caso, la pérdida del dominio que liga heparina se traduce en una disminución significativa de la capacidad mitogénica del VEGF (Keyt y cols., 1996). Así, el VEGF puede encontrarse disponible para ejercer su función sobre las células endoteliales a través de la secreción de isoformas solubles o bien a través de la escisión proteolítica de isoformas unidas a la matriz extracelular.

La hipoxia es uno de los factores inductores de la expresión de VEGF más importantes, ya que la expresión del factor inducible por hipoxia (HIF-1 α) activa la transcripción de los genes del VEGF y sus receptores. En condiciones de hipoxia, se producirá además una sobreexpresión de diversos factores que favorecerán la formación adherencial, entre los que se encuentran el EGF, el TGF- α , el TGF- β , el IGF-1, el FGF o el PDGF, y que son capaces de aumentar la expresión del VEGF. Por eso resulta de vital importancia el grado de isquemia al que se encuentre sometido el tejido dañado.

1.7.1.2 VÍA DE TRANSDUCCIÓN

El VEGF es un factor de crecimiento con actividad mitogénica altamente específica para las células endoteliales vasculares, en cuya superficie se identificaron inicialmente los receptores para este factor. Más tarde se encontraron sus receptores también en células derivadas de la médula ósea (Ferrara y Davis-Smyth, 1997).

El VEGF activo está compuesto por dos subunidades idénticas y es este homodímero el que media la unión a sus receptores. Posteriormente, se produce la dimerización del receptor y la activación de la actividad tirosina quinasa para terminar con la autofosforilación del receptor, que dará lugar a la cascada de transducción de señales.

Posee tres receptores del tipo tirosina quinasa (RTKs): el VEGFR-1, el VEGFR-2 y el VEGFR-3. Además, el VEGF interacciona con una familia de correceptores, las neuropilinas (**figura 5**).

El **VEGFR-1** (Flt-1) fue el primer RTK identificado como receptor del VEGF (de Vries y cols., 1992). Las funciones y propiedades de señalización de este receptor parecen depender tanto del estado de desarrollo del animal como del tipo celular. El VEGFR-1 aumenta su expresión en condiciones de hipoxia, a través de un mecanismo dependiente de HIF-1 (Gerber y cols., 1997). Presenta una débil autofosforilación en respuesta al VEGF (de Vries y cols., 1992; Waltenberger y cols., 1994), por lo que se ha propuesto (Park y cols., 1994) que podría no ser un receptor transmisor de la señal mitogénica, sino más bien un regulador de la actividad del VEGF en el endotelio vascular, ya que impide la unión del VEGF al VEGFR-2. La activación del VEGFR-1 se encuentra relacionada con una respuesta considerable en células endoteliales (Ito y cols., 2001), pero está implicado en la migración de monocitos y progenitores endoteliales en respuesta al VEGF, así como en la inducción de la metaloproteinasa-9 en células endoteliales de pulmón (Barleon y cols., 1996; Hiratsuka y cols., 1998; Hiratsuka y cols., 2002).

El **VEGFR-2** (Flk-1 o KDR) es el principal mediador de los efectos mitogénicos, angiogénicos y de permeabilidad del VEGF, mediante la estimulación de la supervivencia de las células endoteliales vasculares. El promotor del gen del VEGFR-2 no posee sitio de unión a HIF-1, lo que sugiere que la regulación positiva de este gen por la hipoxia es indirecta.

El **VEGFR-3** (Flt-4) es expresado principalmente en el endotelio de los vasos linfáticos. Los ligandos con los que interacciona son el VEGF-D y VEGF-C, siendo éste último un importante regulador de la linfoangiogénesis.

Las **neuropilinas** (NRP1 y NRP2) han sido encontradas en la superficie de células endoteliales y células tumorales. A pesar de que estos receptores son capaces de unir VEGF, no se ha encontrado transducción de señal tras su unión (Neufeld y cols., 2002).

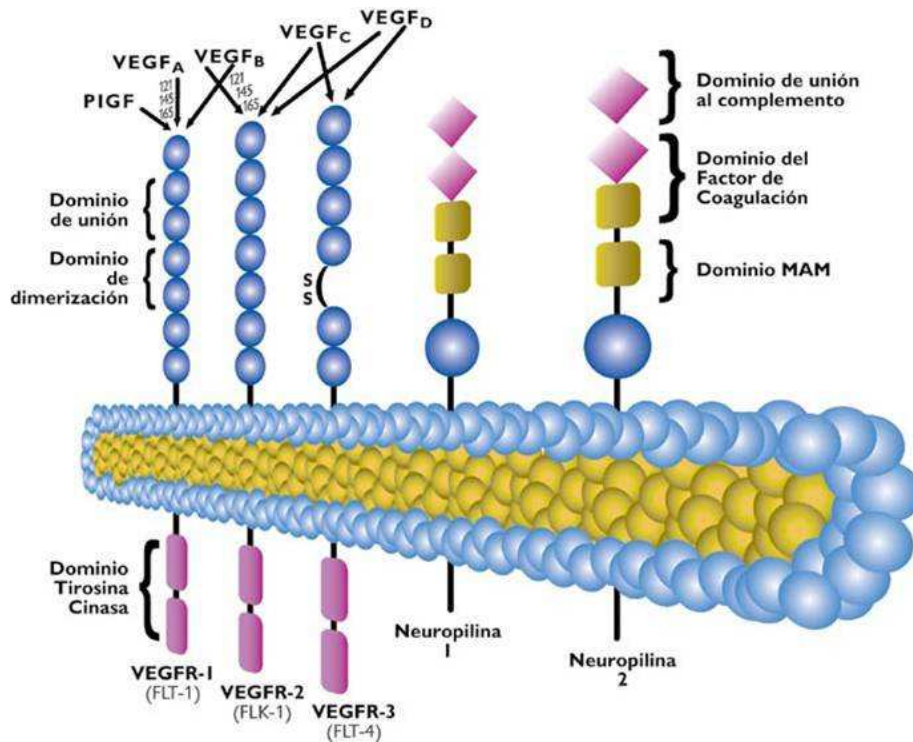


Figura 5: Tipos de VEGF y sus receptores. Tomado de Martínez-Ezquerro y Herrera (2006).

1.7.1.3 ACCIONES BIOLÓGICAS DEL VEGF: SU IMPORTANCIA EN LA FORMACIÓN ADHERENCIAL.

El desarrollo de la vasculatura y el flujo de sangre a los tejidos son esenciales tanto para la organogénesis durante el desarrollo embrionario como para una normal cicatrización de heridas y reparación tisular en el adulto. Así, una angiogénesis anormal juega un papel central en la patogénesis de diversas enfermedades, incluyendo el crecimiento y metástasis de tumores malignos, el desarrollo de retinopatías proliferativas y otras alteraciones (Millauer y cols., 1996; Ferrara y Davis-Smyth, 1997; Zetter, 1998).

A pesar de que varios factores de crecimiento y citocinas han sido implicados como potenciales reguladores de la angiogénesis normal y patológica, se ha establecido la importancia del VEGF y sus receptores en el desarrollo de la vasculatura y en la mediación de la vasculogénesis anómala en enfermedades (Ferrara y Davis-Smyth, 1997; Plate y Warnke, 1997).

El VEGF es un poderoso inductor de la angiogénesis y la linfangiogénesis en diferentes modelos experimentales *in vivo* (Leung y cols., 1989; Nagy y cols., 2002). Actúa, además, como factor de supervivencia para las células endoteliales tanto *in vitro* como *in vivo*.

vivo (Leung y cols., 1989; Bennet y Schultz, 1993; Gerber y cols., 1998a; Gerber y cols., 1998b; Benjamin y cols., 1999).

El papel central del VEGF en la deposición de una matriz rica en fibrina necesaria para la migración y proliferación celular así como su papel en el aumento de la permeabilidad vascular (esencial para la respuesta proinflamatoria temprana) (Dvorak y cols., 1987) hacen de él uno de los factores primordiales en la formación de adherencias peritoneales.

El VEGF es una potente citocina angiogénica de participación reconocida en el proceso de la formación adherencial, debido a su papel inductor de nuevos vasos sanguíneos desarrollados en áreas lesionadas durante una operación quirúrgica. Pero el VEGF también es conocido por estar directamente relacionado con procesos de remodelación tisular, incluyendo las respuestas inflamatorias, así como la reparación de tejido lesionado y remodelación a través de los fibroblastos (Diamond y cols., 2005).

Las células mastocíticas peritoneales expresan esta citocina de manera tanto constitutiva como inducible, lo que sugiere que esta estirpe celular se encuentra implicada en la formación adherencial. Los mastocitos pueden no ser, a pesar de ello, responsables de todo el VEGF secretado localmente, ya que también se encargan de producir otras citocinas que pueden inducir el flujo de células inflamatorias (neutrófilos y monocitos) desde la circulación hasta el peritoneo, y serían estas células las que contribuirían principalmente a los niveles locales de VEGF.

En conclusión, tanto los mastocitos como el VEGF parecen desarrollar importantes funciones en los primeros estadios de la formación de adherencias intraabdominales postoperatorias, siendo los mastocitos responsables, directa o indirectamente, de la secreción de VEGF en la cavidad peritoneal tras una operación quirúrgica. Los niveles de VEGF se correlacionan con la formación adherencial en modelos animales de manera que su regulación, ya sea positiva (Condon y cols., 2007) o negativa (Cahill y cols., 2006), afecta al grado de formación adherencial tras operaciones peritoneales.

1.7.2 EL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE β

Entre una gran cantidad de factores de crecimiento examinados con respecto a su habilidad para acelerar o mejorar el proceso de reparación tisular, ninguno muestra un

espectro de acción tan amplio como lo hace el TGF- β (Roberts, 1995). Desarrolla un papel crucial en la reparación peritoneal y la formación adherencial. De hecho, en un trabajo publicado por Cahill y Redmond (2008) en el que analizaban la bibliografía aparecida hasta esa fecha sobre la implicación de las citocinas y quimiocinas en la formación adherencial postoperatoria, el factor más ampliamente estudiado era el TGF- β .

El TGF- β es una citocina multifuncional (pleiotrópica) que pertenece a una familia de factores de crecimiento celular ubicuos integrada por más de 35 citocinas que incluye a las activinas, inhibinas, proteína morfogénica de hueso (BMP), hormona müleriana y al factor de crecimiento transformante β propiamente dicho. Son capaces de controlar diversos procesos celulares que van desde la proliferación, la diferenciación y la apoptosis en la mayoría de los tipos celulares hasta procesos fisiológicos complejos como son la respuesta inmune, la inflamación, la cicatrización y la reparación de tejidos. Son factores esenciales con un importante papel en el desarrollo embrionario e implicados en varias patologías humanas, incluyendo desórdenes autoinmunes y vasculares, así como enfermedades fibróticas y cáncer.

Factor de crecimiento transformante (TGF- β) es un nombre genérico que se refiere a cinco factores de crecimiento relacionados estructuralmente (Gleizes y cols., 1997). Estos cinco factores presentan alrededor de un 70-80% de homología en sus secuencias aminoacídicas (Massagué, 1990; Massagué y cols., 1990). El TGF- β 1, el TGF- β 2 y el TGF- β 3 son las isoformas más comunes en mamíferos (Kingsley, 1994; Frank y cols., 1996; Coker y cols., 1997; Khalil, 1999; Saed y cols., 2002). Entre los mamíferos, la secuencia de aminoácidos del TGF- β es altamente conservada (cerca del 100%), ya que es idéntica en humanos, cerdos, vacas y monos, y difiere en un aminoácido en ratones (Gálvez-Gastélum y cols., 2004). De manera que el TGF- β humano y sus correspondientes secuencias en otras especies comparten un grado de homología lo suficientemente elevado como para permitir la extrapolación de los datos obtenidos a partir de los diferentes estudios animales al humano (Ghosh y cols., 2005).

A pesar de la estrecha similitud estructural, funcional y de vía de señalización de las diferentes isoformas del TGF- β , cada una de ellas realiza funciones específicas no redundantes (Vilchis-Landeros y cols., 2003).

1.7.2.1 SÍNTESIS, SECRECIÓN Y ACTIVACIÓN DEL TGF- β

Todas las isoformas del TGF- β son sintetizadas como precursores diméricos y secretados al medio extracelular como formas inactivas, los pro-TGF- β . Las formas maduras, también diméricas, se originan a partir de estos precursores. El precursor del TGF- β consta de 392 aminoácidos (100 KDa) (Sosa-Garrocho y Macías-Silva, 2004), de los cuales los 112 residuos que se encuentran en el extremo carboxilo-terminal son los constituyentes de la forma madura (112 aa, 25 KDa), mientras que el resto de residuos, localizados en el extremo amino-terminal, constituyen el LAP (Latency Associated Peptide) (279 aa, 75 KDa), es decir, el péptido asociado de latencia.

El término “latencia” describe una condición en la que una molécula es mantenida en su estado inactivo de forma reversible. La habilidad del LAP para conferir latencia consiste en que evita la unión del TGF- β secretado a sus receptores, careciendo de actividad y asegurando un reservorio extracelular de TGF- β . *In vivo* es almacenado mediante su anclaje a la superficie celular o asociado a la matriz extracelular, donde puede ser activado si existe alguna demanda del mismo, o bien, es almacenado en los gránulos plaquetarios, que constituyen el mayor reservorio de TGF- β del organismo. Además, permite la circulación del TGF- β en su forma inactiva hasta su célula diana y su posterior activación en el lugar deseado. De tal manera que la activación del TGF- β latente constituye un importante punto de control en la función del TGF- β . Una elevada expresión del complejo latente no siempre está relacionada con el incremento en los niveles de TGF- β activo, por lo que puede no tener consecuencias biológicas, mientras que una elevada activación, incluso sin cambios en los niveles de síntesis, puede dar lugar a importantes eventos fisiológicos.

La modificación postranscripcional crítica en la activación del TGF- β es su procesamiento proteolítico en el sitio RXXR en el extremo carboxilo, que es mediado por endopeptidasas como la furina. Sin embargo, el dominio biológicamente activo del TGF- β maduro permanece asociado de manera no covalente a su precursor LAP y de ésta manera será secretado, en forma de complejo latente. Este péptido asociado de latencia es imprescindible en el plegamiento correcto y dimerización de las regiones maduras, así como en un procesamiento postraducciona eficiente.

El TGF- β latente también se puede encontrar formando parte de un complejo terciario grande, LLC (220KDa), en el cual la glicoproteína LTBP (latent TGF- β binding protein) está covalentemente unida al TGF- β latente a través del LAP (**figura 6**). Las LTBP son importantes en la secreción del TGF- β y en algunos casos pueden unirse al LAP-TGF β antes de la secreción de éste al medio extracelular. Una vez allí, los LTBP pueden dificultar la activación del complejo LAP-TGF β , debido al enmascaramiento de ciertos residuos del LAP que le hacen menos susceptible a la activación por parte de diferentes sustancias. Otra de las funciones del LTBP consiste en dirigir el TGF- β a la matriz extracelular, donde será almacenado. La unión a la matriz extracelular puede incluir la unión a través de una transglutaminasa, de manera que el LAP-TGF β requerirá del procesamiento proteolítico que lo libere del LTBP previamente a su activación (Barcellos-Hoff y Ewan, 2000).

Cabe citar que más del 90% de las LTBP no se encuentran unidas al TGF- β y probablemente tienen un papel más bien estructural en la matriz extracelular (Roberts, 1998). Este papel como proteína estructural de la matriz extracelular en los tejidos es apoyado, así mismo, por la homología que comparten las LTBP con las fibrilinas 1 y 2, constituyentes importantes de la estructura microfibrilar del tejido conectivo (Gleizes y cols., 1997; Sinha y cols., 1998; Sinha y cols., 2002).

El proceso de disociación entre el factor maduro y el LAP puede llevarse a cabo *in vitro* mediante cambios de temperatura o de pH, por la acción de algunas proteasas, de detergentes como el SDS o por agentes caotrópicos como la urea.

El proceso de activación *in vivo* resulta más complejo. Uno de los mecanismos propuestos involucra la acción de la plasmina en colaboración con el receptor de la manosa-6-fosfato y una actividad de transglutaminasa en un proceso que requiere de varias estirpes celulares. El sistema proteolítico plasminógeno/plasmina es activador del complejo latente LAP-TGF β . La formación de plasmina constituye una importante fuente de actividad proteolítica localizada que, además de resultar de interés en la fibrinólisis, es fundamental en una gran variedad de funciones celulares, incluidas aquellas mediadas por la activación del LAP-TGF β . De manera que las células que son estimuladas para generar TGF- β activo pueden disminuir la activación del LAP-TGF β mediada por plasmina a través de la inducción de PAI-1.

También se ha propuesto que la trombospondina-1 (TSP-1), una glicoproteína de matriz extracelular, participa en la liberación del TGF- β del complejo LAP-TGF β (Crawford y cols., 1998). El mecanismo propuesto consiste en la unión específica de la TSP-1 y el LAP. Esta unión es mediada por dos péptidos cortos localizados en cada una de estas proteínas: las secuencias KRFK₄₁₅ en la TPS-1 y LSKL₅₇ en el LAP (Ribeiro y cols., 1999). La unión de la TSP-1 al complejo LAP-TGF β a través de este mecanismo provoca un cambio en la conformación de éste último permitiendo que el TGF- β se una con su receptor.

Otra proteína capaz de activar al TGF- β 1 gracias a su unión con el LAP es la integrina $\alpha\beta$ 6. Sin embargo, esta proteína permite al TGF- β unirse a su receptor sin liberarlo del complejo LAP-TGF β (Munger y cols., 1999).

Otro mecanismo alternativo de activación del LAP-TGF β viene mediado por las especies reactivas de oxígeno (ROS). El mecanismo a través del cual la hipoxia aumenta la producción de TGF- β 1 requiere de la participación de especies reactivas de oxígeno inducidas por hipoxia, como el O₂⁻ y el ONOO⁻ (Fletcher y cols., 2008), que no afectan al propio TGF- β , pero son capaces de producir alteraciones en el LAP mediante la oxidación de sus residuos cisteína o metionina. Esto provoca la alteración de la estabilidad del LAP, que pierde su asociación no covalente en el complejo LAP-TGF β , o bien puede sufrir un cambio conformacional que le lleve a exponer la zona de unión al receptor del TGF- β . Sin embargo, aún no se sabe si estos mecanismos de activación son selectivos *in vivo* para alguna isoforma particular del TGF- β , sí se ha especulado con la posibilidad de que los efectos de las ROS podrían ser específicos para el LAP del TGF- β 1 (Barcellos-Hoff y Dix, 1996). Estas especies reactivas controlan la síntesis de citocinas y factores de crecimiento en varios modelos *in vitro* (Lander, 1997).

Una vez activado, es decir, una vez liberado del complejo LAP-TGF β , el TGF- β posee una vida media corta. Por ese motivo, la activación del complejo LAP TGF- β ocurre extracelularmente, de manera que el TGF- β activo sea liberado cerca de la superficie celular y se una inmediatamente a sus receptores. El TGF- β activo puede ser, también, degradado por proteasas y elastasas en el sitio de la inflamación o excretado en la orina (Clark y Coker, 1998).

Alternativamente, puede unirse a proteínas que inhiban su actividad (como la α -macroglobulina o la decorina) o a acarreadores que no interfieran con su actividad (como

la albúmina y las IgGs). Otras proteínas que unen al TGF- β y que podrían alterar su disponibilidad para unirse a su receptor son el betaglicano, el precursor β -amiloides y la α -fetoproteína. Así mismo, la disminución del número de receptores de TGF- β podría también conducir a una disminución de los efectos del TGF- β .

De manera que la combinación de todos estos eventos será la responsable del control de las acciones del TGF- β .

1.7.2.2 VÍA DE TRANSDUCCIÓN

El TGF- β es un factor polipeptídico dimérico que se une con alta afinidad a diversas proteínas membranales de las cuales sólo dos son indispensables para transmitir la señal del TGF- β (de cualquiera de sus tres isoformas) al interior celular. El **receptor tipo I** (denominado como **T β R-I** o **ALK-5**) y el **receptor tipo II** (**T β R-II**) son considerados como los auténticos “receptores de señalización”. En ausencia de ligando, estos receptores existen como homodímeros en la superficie celular, y todas las respuestas celulares al TGF- β son consecuencia de la interacción del homodímero de TGF- β de 25 kDa con ellos.

Los receptores tipo I y tipo II del TGF- β son proteínas transmembranales cuyas porciones extracelulares unen al factor, y sus regiones intracelulares son quinasas de proteínas que fosforilan residuos serina y treonina. Los complejos del receptor son heterotetraméricos y consisten en dos receptores tipo II, a los cuales se une el TGF- β , induciendo así la formación de un complejo con dos receptores tipo I, receptor que es incapaz de unir por sí mismo al ligando. Esta asociación permite que la quinasa del receptor tipo II, que es constitutivamente activa, fosforile una importante región reguladora exclusiva del receptor tipo I, la región GS, llamada así por su alto contenido de glicinas y serinas. La fosforilación de los residuos Thr¹⁸⁵, Ser¹⁸⁷, Ser¹⁸⁹, y Ser¹⁹¹ de la región GS del receptor tipo I resulta en la activación de su quinasa, que sufre un cambio conformacional.

Así, se favorece la separación de una proteína inhibidora del TGF- β , la inmunofilina FKBP12 (Huse y cols., 2001), que se encuentra unida a la región GS en su estado desfosforilado, manteniendo a la quinasa en una conformación no catalítica. La fosforilación de la región GS no sólo impide la unión de FKBP12, sino que crea un

eficiente sitio de unión para los sustratos de la quinasa del receptor permitiendo la propagación de la señal del TGF- β (Wrana y cols., 1994)

La propagación de la señal se realiza a través de una familia de reguladores transcripcionales, las proteínas Smad, sustratos fisiológicos de la quinasa del receptor tipo I (Massagué, 2000). Las R-Smads son las Smads que son fosforiladas por la quinasa de un receptor tipo I y controlan la expresión de genes blanco a través de los cuales el TGF- β ejerce múltiples funciones. Las R-Smads fosforiladas se asocian con otro tipo de Smads, las Co-Smads, formando complejos que llevan la señal del TGF- β al núcleo celular. Las Smads representan, por tanto, un punto importante de autorregulación de la señalización del TGF- β . Esta autorregulación es mediada por variantes de las Smads que carecen de alguno de sus dominios y por ello bloquean la vía del TGF- β .

Existen evidencias de que el TGF- β es capaz de activar otras vías de transducción en paralelo a las Smad, como la vía clásica de las MAPKs y la vía de PI3K, entre otras. La activación de estas vías parece ser más importante en las funciones del TGF- β relacionadas con la regulación de la matriz extracelular.

Además de los receptores tipo I y II, existen otros receptores accesorios del TGF- β : el betaglicano y la endogлина (Massagué, 1998). El betaglicano, también conocido como el receptor tipo III del TGF- β se expresa en células mesenquimales, epiteliales, neuronales y otros tipos celulares de tejido fetal y adulto. Sin embargo, no está presente en células como mioblastos, endotelios y células hematopoyéticas que también tienen la capacidad de responder al TGF- β , lo cual sugiere que no participan directamente en la transducción del TGF- β ; de ahí su clasificación como accesorio. El betaglicano se une a través de su región extracelular de 100 kDa. Dado que este receptor se une al TGF- β con alta afinidad y es capaz de modular la señal que éste produce al controlar la interacción del factor con los receptores de señalización (Massagué, 1998), resulta más apropiado el término de co-receptor que el de receptor accesorio.

El betaglicano actúa como un modulador de la señal del TGF- β , ya que va a controlar su interacción con sus receptores de señalización cuando se encuentra en su forma anclada a membrana. Puede, en ese caso, mediar la llegada del TGF- β maduro hasta sus receptores y formar complejos que regulen la asociación de los receptores I y II, necesarios para desencadenar la señalización de este factor. Así, la presencia de betaglicano podría facilitar la actividad biológica del TGF- β (figura 6).

La forma soluble del betaglicano se encuentra normalmente en suero y matrices extracelulares y se produce a partir del corte proteolítico, aún no bien caracterizado, de la porción extracelular del receptor membranal (Andres, 1989; López-Casillas y cols., 1994; Arribas, 1997). La forma no anclada a membrana de este proteoglicano sigue siendo capaz de unir el TGF- β . Sin embargo, a diferencia de la forma anclada a membrana, no facilitará su llegada a sus receptores de señalización. Su acción es completamente opuesta, ya que lo mantendrá alejado de ellos, “secuestrado”. Evitando así que el TGF- β pueda acceder a los receptores de señalización y ejercer su acción biológica (**figura 6**).

La versión recombinante del betaglicano soluble es inhibitoria del TGF- β . Estos hallazgos sugieren que el betaglicano sirve como un interruptor que puede potenciar o inhibir los efectos del TGF- β (Attisano y cols., 1994). Aunque el betaglicano puede ser determinante en la modulación del acceso del TGF- β a sus receptores en algunos tipos celulares, no es limitante en el inicio de la señal (Sosa-Garrocho y Macías-Silva, 2004).

La **endoglina** es una glicoproteína que comparte algunas características con el betaglicano y se expresa abundantemente en células endoteliales vasculares. Une selectivamente al TGF- β 1 y al TGF- β 3, pero no al TGF- β 2.

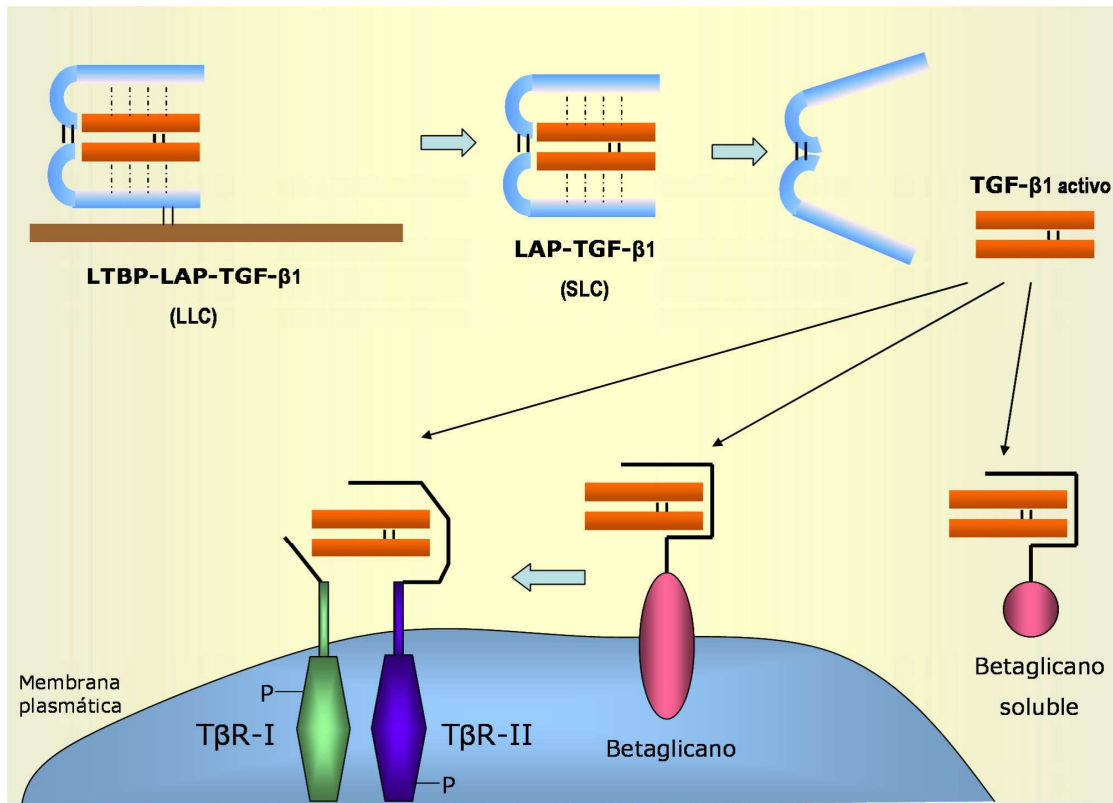


Figura 6: El TGF- β puede almacenarse en la MEC en su forma latente a través de la unión covalente con la LTBP. La activación del TGF- β latente ocurre, normalmente, a través de dos pasos. En primer lugar debe liberarse del LTBP y, posteriormente, disociarse del LAP. Una vez libre la forma madura del TGF- β , puede unirse a sus receptores. El mecanismo de señalización comienza en la membrana plasmática, donde el TGF- β se une al receptor tipo II (T β R-II). Esta unión permite su interacción con el receptor tipo I (T β R-I) para formar el complejo de señalización. El betaglicano, o receptor tipo III del TGF- β puede funcionar como un regulador bifuncional de éste: promoviendo la formación de un complejo activo de señalización entre el TGF- β y sus receptores tipo I y II o bien neutralizando los efectos del TGF- β a través de la unión de su forma soluble. Modificado de Vilchis-Landeros y cols. (2003), Sosa-Garrocho y Macías-Silva (2004) y O' Kane y Ferguson (1997).

1.7.2.3 ACCIONES BIOLÓGICAS DEL TGF- β : SU IMPORTANCIA EN LA FORMACIÓN ADHERENCIAL

Las funciones del TGF- β , así como los procesos fisiológicos en los que participa, son muy numerosos, ya que casi todos los tipos celulares pueden secretarlo y expresar sus receptores. Los TGF- β modulan el crecimiento, diferenciación, angiogénesis, respuesta inflamatoria e inmune y remodelación tisular en el proceso de cicatrización, tanto normal como patológico, de varios tejidos (Saed y cols., 2002).

Tras una lesión, se produce la liberación plaquetaria de TGF- β en el sitio de la herida, que inicia una cascada de eventos entre los que se encuentran: la síntesis de matriz extracelular que dará soporte a la herida (Roberts y Sporn, 1993), la formación de nuevos vasos sanguíneos y la quimiotaxis de macrófagos, fibroblastos, neutrófilos y linfocitos (mediante la alteración de la adhesión celular y, por tanto, de la interacción entre ellas) (Bennet y Schultz, 1993; Letterio y Roberts, 1998).

Todos estos eventos, de duración limitada, son necesarios en la reparación de heridas. Sin embargo, el problema se presenta cuando su duración es demasiado larga. Se produce, entonces, un incremento incontrolado en la producción y/o activación del TGF- β . Esto conlleva una producción excesiva de tejido conectivo que puede derivar en una acumulación patológica de matriz que algunas veces viene acompañada de cicatrización. Tal y como se encuentra en ciertas enfermedades como pueden ser la cirrosis hepática, la fibrosis pulmonar idiopática, escleroderma, glomerulonefritis, ciertas formas de artritis reumatoide, esquistosomiasis y vitreoretinopatía proliferativa (Border y Ruoslahti, 1992; Wahi, 1992; Border y Noble, 1994).

1.7.2.3.1 Influencia en la fibrogénesis

El TGF- β controla la producción de los componentes de la matriz extracelular incrementando la síntesis y depósito de componentes extracelulares tales como fibronectina, proteoglicanos, algunas formas de colágeno y de inhibidores de enzimas de degradación como el inhibidor tisular de metaloproteasas, a la vez que provoca una disminución en la expresión de proteasas como la colagenasa. También actúa sobre el proceso fibrinolítico a través de una disminución en la producción de PA y el aumento en la producción del PAI. Además, induce la expresión de integrinas y receptores que

median las interacciones celulares con proteínas de matriz extracelular. Estos hechos conducen a una acumulación neta de proteínas de matriz, favoreciendo la fibrogénesis.

En el año 2001, Holmdahl (Holmdahl y cols., 2001) arrojaba luz sobre el mecanismo mediante el cual una sobreexpresión de TGF- β 1 favorece la formación de adherencias, implicando al proceso fibrinolítico y a las alteraciones que éste podía sufrir durante el procedimiento quirúrgico.

En cultivos celulares ya se había observado la modulación de la expresión de componentes del sistema fibrinolítico por parte del TGF- β 1 de manera dependiente de la dosis, de manera que resultaba en una disminución de la capacidad de degradación de la fibrina en células mesoteliales omentales (Tietze y cols., 1998) y en células mesoteliales peritoneales (Falk y cols., 2000).

El dramático incremento del PAI-1 tras la estimulación con TGF- β 1 de las células mesoteliales omentales puede obstaculizar la apropiada curación peritoneal, favoreciendo la formación adherencial y la fibrogénesis tras una agresión química o infecciosa a través de, al menos, tres mecanismos diferentes:

- a) En primer lugar, la acumulación de PAI-1 en la matriz extracelular inducida por TGF- β 1 puede inhibir la migración de las células mesoteliales o de las células indiferenciadas no comprometidas del tejido conectivo submesotelial hacia el área denudada, proceso necesario en la reparación de la capa celular continua que recubre la cavidad peritoneal y en la síntesis de nueva membrana basal. Las células mesoteliales expresan el receptor $\alpha_v\beta_3$ (VN_r) para la vitronectina, componente de la matriz extracelular por el que el PAI-1 exhibe alta afinidad. Si se requiere el (VN_r) $\alpha_v\beta_3$ para la migración celular mesotelial, el exceso de PAI-1 en las células estimuladas por TGF- β podría inhibir la migración celular al impedir las interacciones VN_r-vitronectina. El impedimento de la remesotelización mesotelial también contribuirá a la disminución de la actividad fibrinolítica en la zona dañada, ya que las células mesoteliales secretan tPA y uPA unido a membrana. Sin embargo, otros autores (Deng y cols., 1996; Waltz y cols., 1997) defienden que el PAI-1 es capaz de promover la migración celular probablemente mediante la disminución de la fuerza de adhesión de otro receptor expresado por las células mesoteliales, el uPA_r, a la vitronectina.

- b) En segundo lugar, a parte de su influencia directa sobre las interacciones célula-matriz, el PAI-1 también inhibe la formación de plasmina y la activación de las metaloproteinasas de matriz secretadas como proenzimas, enzimas que estimulan la migración celular por el aumento en la remodelación de la matriz (Henkin y cols., 1991). El papel profibrogénico del PAI-1 se ha demostrado indirectamente por los importantes efectos protectores de la generación de plasmina inducida por tPA en un modelo de glomerulonefritis experimental (Kitching y cols., 1997)
- c) Por último, el PAI-1 puede inhibir la eliminación de la fibrina y por tanto favorecer su deposición (Holmdahl y cols., 2001), de manera que los fibroblastos proliferen sobre ella y secreten colágenos intersticiales, favoreciendo así el proceso fibrogénico.

Se ha demostrado la influencia del PAI-1 en casos de fibrosis pulmonar en ratones que habían sido manipulados bien para sobreexpresar o ser completamente deficientes en PAI-1 (Eitzman y cols., 1996; Barazzzone y cols., 1996). En humanos se ha relacionado el desarrollo de fibrosis glomerular (Rondeau y cols., 1990) o pulmonar (Idell y cols., 1989; Bertozzi y cols., 1990) con un aumento en la secreción de PAI-1.

Tomando como base estos hechos, Holmdahl y cols. (Holmdahl y cols., 2001) decidieron estudiar la relación entre un proceso fibrinolítico comprometido y el aumento de la expresión de TGF- β 1 que conduciría a la formación adherencial. Encontraron una correlación directa entre los niveles de TGF- β 1 y el PAI-1 tanto en secciones de peritoneo como en tejido adherencial, siendo en éste último especialmente evidente la relación. Parece ser que el TGF- β 1 liberado por los gránulos plaquetarios alfa de las plaquetas activadas contribuye, al menos en parte, a la reducción de la capacidad fibrinolítica peritoneal observada durante el transcurso de la operación quirúrgica, favoreciendo la formación adherencial.

1.7.2.3.2 Relación con la respuesta inmune y la red de citocinas

De las tres isoformas de TGF- β existentes, la isoforma predominante es el TGF- β 1, que además de ser liberado por las plaquetas, es producido por diversas células del

sistema inmunológico, incluidos linfocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas. El TGF- β producido por estas células participa en la atracción quimiotáctica de células inflamatorias y en la activación o supresión de las mismas, dependiendo de la concentración local de esta citocina y del grado de diferenciación de sus células blanco (Letterio y Roberts, 1998). Es un factor pro-inflamatorio que estimula la inmunidad no específica y la respuesta inmune inicial a un nuevo antígeno, pero es inmunosupresor si un antígeno ha sido reconocido previamente (Slavin, 1996). Estas propiedades indican que los TGF- β son unos reguladores muy importantes de la reparación de las heridas *in vivo* (Bennet y Schultz, 1993).

En la fase inicial del proceso inflamatorio existen concentraciones de TGF- β en cantidad suficiente para participar de manera eficiente en la quimiotaxis de monocitos y linfocitos sanguíneos (Wahl y cols., 1987). A medida que progresa la respuesta inflamatoria, la concentración de TGF- β aumenta hasta el orden de picomoles debido a la presencia de una mayor cantidad de células participantes que constituyen fuentes adicionales de TGF- β . A estas concentraciones, el TGF- β activa a los monocitos, incrementando la expresión genética de citocinas proinflamatorias como la IL-1, el TNF- α y el PDGF, entre otras (McCartney-Francis y cols., 1990).

Existen numerosos ejemplos de la capacidad del TGF- β para sinergizar o antagonizar las acciones de diversos factores como el HGF, PDGF y FGF, dependiendo del tipo celular (Sosa-Garrocho y Macías-Silva, 2004). A su vez, cada una de estas citocinas tiene importantes funciones promotoras de la inflamación y activación de la respuesta inmunológica. Por eso, se considera que la participación proinflamatoria del TGF- β durante el proceso inflamatorio es indirecta, ya que es mediada a través de la atracción y activación de monocitos para que éstos generen otras citocinas que magnifiquen la respuesta inflamatoria. Es también durante estas etapas de la inflamación cuando el TGF- β atrae quimiotácticamente y activa a fibroblastos y células endoteliales (Wahl, 1992), iniciando así el proceso de regeneración y cicatrización del tejido lesionado. También resulta importante destacar el control autocrino del TGF- β mediante el cual induce su propia producción actuando sobre todo en monocitos (Kim y cols., 1990).

Si el efecto proinflamatorio que tiene el TGF- β al inicio de la inflamación fuera constante, éste se convertiría en un mecanismo de lesión tisular, debido al continuo reclutamiento y activación de células inflamatorias. Sin embargo, la misma respuesta

inflamatoria está dotada de mecanismos que suprimen las respuestas proinflamatorias y así evitan la inflamación excesiva que es capaz de producir daño tisular. Cuando la inflamación es extensa, existen muchas células que producen TGF- β induciendo concentraciones de esta citocina del orden de los nanomoles. A estas concentraciones actúa como una citocina antiinflamatoria, tal vez porque en este momento existen células macrofágicas más diferenciadas que se desactivan ante la exposición a elevadas concentraciones. La desactivación de los macrófagos puede llevarse a cabo a través de la inhibición directa de la producción de radicales libres de oxígeno y óxido nítrico, o de forma indirecta al suprimir la producción de citocinas activadoras de macrófagos como el TNF- α y el IFN- γ y sus receptores (Ranges y cols., 1987; Pinson y cols., 1992).

El TGF- β 1 puede suprimir la proliferación y diferenciación de células B y T *in vitro*, antagonizando los efectos de citocinas como el IL-1 β , el TNF- α o el IFN- γ , y suprimiendo la expresión de receptores para IL-1 β e IL-2. Con respecto a los linfocitos B, el TGF- β es capaz de inducir muerte celular por apoptosis. En cuanto a los linfocitos T, son los maduros ya activados los que sufren una inhibición en su proliferación, mientras que los no activados son relativamente resistentes al efecto anti-mitogénico del TGF- β . Existe una relación con el subtipo de linfocito, ya que el efecto inhibitorio del TGF- β es considerablemente mayor en las células CD4 que en las CD8 (Inge y cols., 1992). Recientemente se han descrito las células T reguladoras CD4+CD25+ que al contactar con la membrana de linfocitos CD4 o CD8 suprimen su actividad a través del TGF- β (Shevach, 2002). También puede suprimir la diferenciación y actividad citolítica de las células NK (Lomo y cols., 1995).

Otro efecto inhibitorio del TGF- β es la supresión de la expresión de las moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en macrófagos (Czarniecki y cols., 1988), con lo cual interfiere en el proceso de presentación antigénica evitando la activación de los linfocitos T. El resultado más importante de esta interferencia es la inhibición de la secreción de IL-2, que es un factor inductor de proliferación celular. De hecho, se considera que éste es el principal mecanismo por el cual el TGF- β inhibe la proliferación linfocitaria. El TGF- β también inhibe su producción de manera directa e indirecta a través de la supresión de la expresión de su receptor específico al mismo tiempo que aumenta la liberación del receptor soluble antagonista de IL-1, cuya función es atrapar y evitar la unión de esta citocina con su receptor (Turner y cols., 1991). Por lo

tanto, además del control que otras citocinas, factores de crecimiento y hormonas presentes en el microambiente de la respuesta inflamatoria ejercen sobre su actividad biológica (Sporn y Roberts, 1992), el efecto regulador del TGF- β en la inflamación es dependiente de sus concentraciones y del grado de maduración de sus células blanco.

El TGF- β 1 también induce otros eventos intracelulares como la regulación de factores de crecimiento que intervienen en la diferenciación celular. Induce: cambios de expresión de los genes jun-B, c-fos y c-myc; recambio de IP3; evita la fosforilación de la proteína Rb (retinoblastoma), dependiente del contacto célula-célula; e induce la activación de proteínas G (Peralta-Zaragoza y cols., 2001).

Otras de las células pertenecientes al sistema inmune que poseen mayor influencia en la regulación del TGF- β son los mastocitos, considerados pro-inflamatorios y que desarrollan un papel primordial en la remodelación de la matriz extracelular. Proporcionan un nexo único entre los sistemas inmunes innato y adquirido. A pesar de su capacidad para secretar rápidamente sustancias metabolizadas como la histamina podría ser beneficiosa para la defensa epitelial contra parásitos y toxinas, los mastocitos también secretan muchas de las citocinas proinflamatorias requeridas en la reacción celular inflamatoria (flujo de macrófagos y neutrófilos) a la infección y a la lesión del tejido conectivo. Como células residentes en el peritoneo, están bien situados y funcionalmente adaptados para controlar el grado de respuesta del ambiente local a la agresión y, por tanto, varios autores proponen que podrían estar involucrados en la formación adherencial (Persinger y cols., 1983; Liebman y cols., 1993).

En la formación adherencial peritoneal humana se han propuesto y llevado a cabo experimentalmente mecanismos relacionados con la degranulación mastocítica, en particular con la serino-proteasa denominada quimasa. La quimasa estimula la degradación de colágeno tipo I ya que activa directamente la MMP-1, sin requerir otras proteasas y/o co-factores (Rojas y Rudolph, 2005). También es capaz de inactivar el TIMP-1 (Saarinen y cols., 1994; Frank y cols., 2001). Además, contribuye a la degradación del colágeno tipo IV de membranas basales y activa a MMP-2, MMP-3 y MMP-9 (Suzuki y cols., 1995; Fang y cols., 1997; Fang y cols., 1999), lo que potencia la capacidad degradativa de la matriz extracelular por parte de los mastocitos. Sin embargo, la quimasa tiene un efecto contrario que pasa por la activación del TGF- β latente asociado a la matriz extracelular y la inducción de la formación de fibras de colágeno mediante la escisión del

procolágeno I (Taipale y cols., 1995; Kofford y cols., 1997). La quimasa es capaz, además, de activar el precursor de IL-1 (Mizutani y cols., 1991) estimulando así la inflamación.

Los mastocitos también pueden estimular la angiogénesis directamente debido a su alto contenido de triptasa, o indirectamente debido a la capacidad de la quimasa para convertir angiotensina I a angiotensina II (Muramatsu y cols., 2000).

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Hoy en día, se encuentra muy extendida la utilización de biomateriales como mallas protésicas en la reparación de defectos de pared abdominal. Una de las principales complicaciones que acarrea su implante es la formación de adherencias desde las vísceras a la malla, especialmente cuando se emplean mallas reticulares como las de polipropileno. La reducción o prevención de las adherencias peritoneales, complicación frecuente y no deseada tras un procedimiento quirúrgico, constituye un objetivo prioritario en la disminución de la morbilidad del proceder quirúrgico en dicho territorio.

De todas las medidas preventivas comentadas en la introducción, ninguna de ellas muestra una eficacia absoluta, y la simple incisión que permite el acceso a la cavidad peritoneal para la realización de cualquier procedimiento quirúrgico suele ser un lugar de desarrollo adherencial. Una vez formadas las adherencias, la única medida a tomar es la resección de las mismas. Sin embargo, esta acción no siempre está aconsejada y en un elevado porcentaje de los pacientes suele conducir a la reformación adherencial, empeorando la situación previa. Dentro de esta medida, no existe en la actualidad ningún protocolo estándar que pueda ser orientativo para conseguir una inhibición eficaz de la reformación adherencial.

El establecimiento de un protocolo requiere de un estudio exhaustivo de los mecanismos de formación de las adherencias, su diferenciación y establecimiento como tejido. El estudio de la evolución de la formación adherencial en humanos es poco factible, limitando el conocimiento de su fisiopatología, por lo que la aproximación al problema nos condujo al diseño de un modelo experimental animal que nos permitiera esclarecer y aportar hechos experimentales que pudieran ofrecer posibles soluciones a ser llevadas a cabo en la práctica clínica.

Estos hechos nos motivaron a plantearnos la siguiente pregunta de **hipótesis**:

¿Se puede definir un momento óptimo para la realización de la adhesiolisis como medida preventiva de la reformación adherencial a partir de las características del tejido que las constituye?

Con la finalidad de dar respuesta a nuestra hipótesis nos propusimos los siguientes **objetivos**:

1. Nuestro **primer objetivo** fue el estudio del tejido adherencial a diferentes tiempos para la valoración de varios aspectos:
 - 1.1. Conocimiento del proceso de la formación adherencial y su estabilización y evolución en el tiempo, haciendo especial hincapié en la citoarquitectura tisular y el papel funcional de factores de crecimiento implicados en la activación del omentum y el desarrollo adherencial.
 - 1.2. Determinación del momento de estabilización de la adherencia que supone su irreversibilidad.
2. Una vez determinado dicho período, se utilizó este tejido como fuente celular para la realización de los estudios *in vitro* que constituyeron nuestro **segundo objetivo**, abordando los siguientes puntos:
 - 2.1. Determinación de las características de las células mesenquimales presentes en el omentum activado por el implante del biomaterial.
 - 2.2. Estudio comparativo de su capacidad de proliferación, fenotipo y comportamiento en cultivo con respecto a las células procedentes de las adherencias.
3. Partiendo del conocimiento previo hallado en el estudio del tejido adherencial y de la población celular, nos planteamos la evolución de este tejido a tiempo más largos y posibilidad de la eliminación de esta complicación quirúrgica. Por ello, en nuestro **tercer objetivo** se llevaron a cabo los siguientes puntos
 - 3.1. Diseño de un modelo de laparoscopia secuencial para la evaluación del proceso de formación/reformación adherencial a corto y largo plazo.
 - 3.2. Estudio de la eficacia de la resección adherencial en la prevención de la reformación adherencial. La elección de este momento se realizó en base a los resultados obtenidos a partir de los objetivos anteriores.
 - 3.3. Análisis de las características tisulares del tejido adherencial a largo plazo (90 días post-implante).

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 PRIMER OBJETIVO

Nuestro primer objetivo fue el estudio del tejido adherencial a diferentes tiempos para la valoración de varios aspectos:

- 1) Conocimiento de la formación y evolución adherencial desde su inicio, su progresión, estabilización y comportamiento a largo plazo. Se hizo especial hincapié en el análisis de su citoarquitectura tisular y el papel funcional de factores de crecimiento que se hallan implicados en la activación del omentum y que participan en el proceso de formación adherencial.
- 2) Determinación del momento de estabilización del tejido que conduce a la irreversibilidad de la adherencia. Una vez determinado dicho período, se utilizó este tejido como fuente celular para la realización de los estudios *in vitro* en nuestro segundo objetivo.

3.1.1 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.1.1 ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Fueron empleados 30 conejos blancos Nueva Zelanda, machos, de un peso aproximado de 3000-3200 g al comienzo del estudio. Los animales fueron mantenidos en un módulo de estabulación para el alojamiento individual de cada uno de ellos. La alimentación consistió en una dieta completa de mantenimiento para conejo (PANLAB®) que fue administrada tanto en el período preoperatorio como a partir de las veinticuatro horas del postoperatorio. Las condiciones de luz y temperatura fueron constantes durante todo el tiempo de estudio. El manejo de los animales se hizo conforme a la Normativa Internacional vigente sobre animales de experimentación (CEE 2871-22 A9).

3.1.1.2 TÉCNICA ANESTÉSICA

En todos los casos la técnica fue estéril y los animales se anestesiaron mediante la inyección por vía intramuscular de un "cocktail" compuesto por clorhidrato de ketamina (Ketolar®, Parke-Davis, Spain) Diazepam (Valium®, Roche, Spain) y Clorpromacina (Largactil®, Rhone-Poulenc, Spain). La ketamina es un excelente tranquilizante y a altas

dosis (más de 44 mg/kg) produce inmovilización, pasados ocho a diez minutos de su administración; por otro lado, estimula la respiración y aumenta la presión arterial a dosis mayores de 60 mg/kg. Este efecto se contrarresta mediante la administración de clorpromacina. Al "cocktail" se añaden, además, las propiedades sedantes del diazepam.

Las dosis empleadas fueron las siguientes:

- Ketamina HCl..... 70 mg/kg
- Diazepam..... 1,5 mg/kg
- Clorpromacina..... 1,5 mg/kg

3.1.1.3 MATERIAL PROTÉSICO

Como material protésico se empleó una malla de Surgipro® (Covidien, Mansfield, MA) (**figura 7**) de un tamaño de 5 x 3.5 cm. Es una malla de polipropileno de alta densidad (85 g/m²) con un poro de 0.26±0.03 mm².

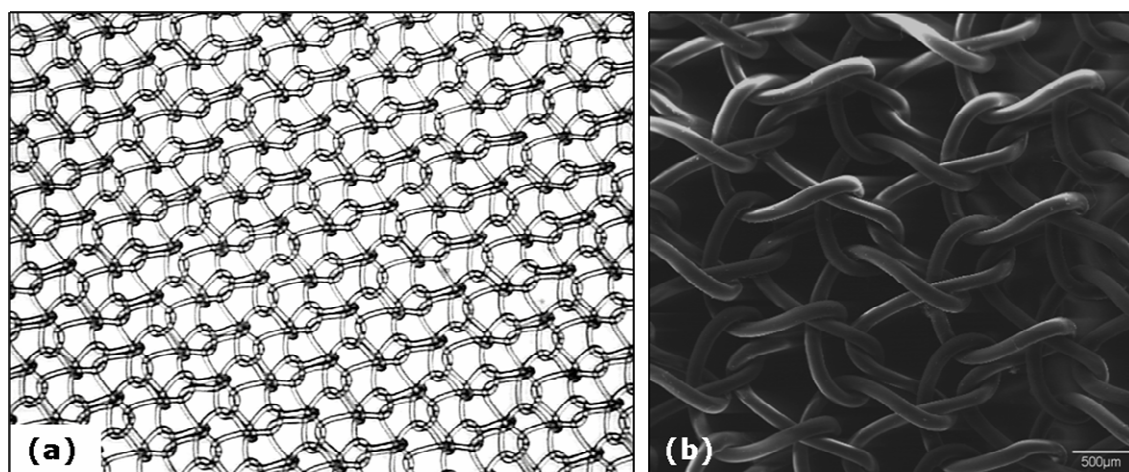


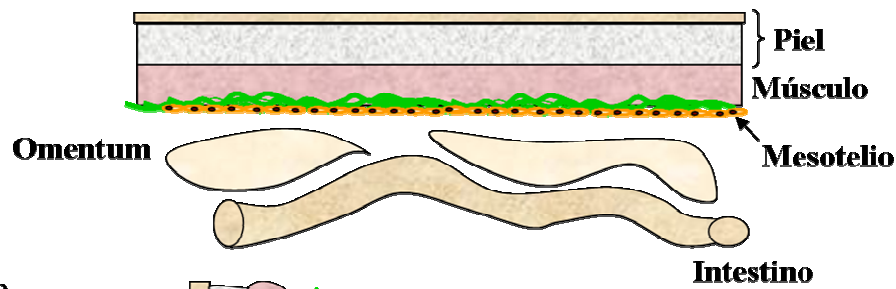
Figura 7: Vista de la malla de propileno empleada. (a) 16x; (b) Imagen de microscopía electrónica de barrido, 20x.

3.1.1.4 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

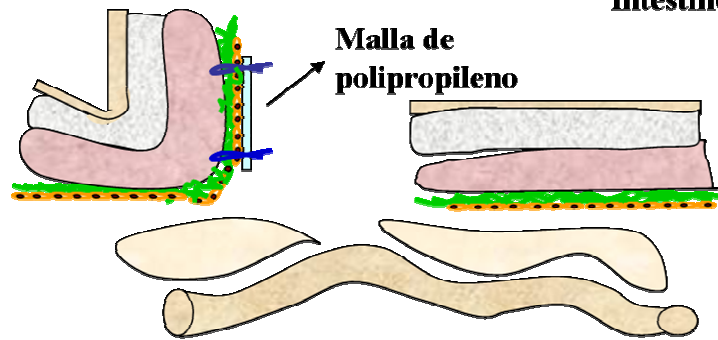
Mediante una técnica quirúrgica estéril, los animales fueron sometidos a una laparotomía media de 8 cm de longitud. A través de esta apertura, y en la vertiente izquierda de la cavidad peritoneal del animal, fue implantado el material protésico. Para ello, fue fijado al peritoneo parietal mediante seis puntos transmurales de polipropileno 4/0 (Tyco. Madrid. Spain) distribuidos a lo largo de cada uno de los lados de mayor longitud (tres en la parte superior y tres en la inferior) (**figuras 8 y 9**). De esta forma una

de las caras de la prótesis quedaba siempre en contacto con el peritoneo visceral, procurando en todo momento que la técnica fuera lo menos traumática posible. Finalizado el implante, la pared abdominal fue cerrada en un plano con una sutura continua de polipropileno 3/0 y agrafes metálicos en el plano cutáneo.

(a)



(b)



(c)

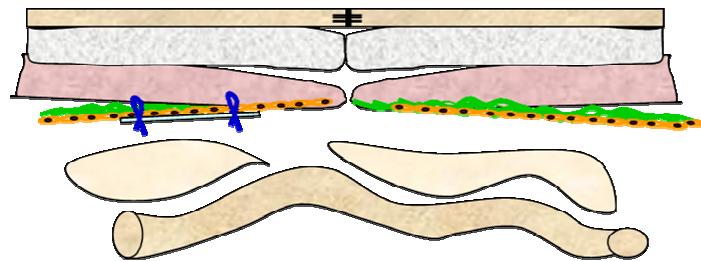


Figura 8: Esquema representativo de la colocación de la malla protésica de polipropileno. (a) Estructura de la región abdominal intacta. (b) Se realizó una laparotomía media y se fijó la malla al peritoneo parietal, de manera que ésta quedara en contacto con el peritoneo visceral y el omentum (c).

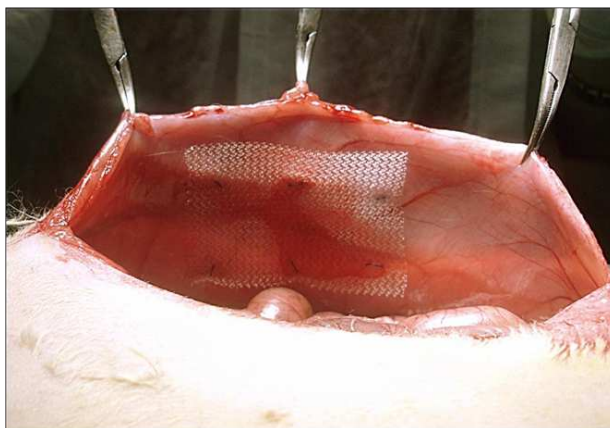


Figura 9: Imagen macroscópica de la malla de polipropileno, una vez implantada en la cavidad abdominal del animal.

3.1.1.5 GRUPOS DE ESTUDIO

GRUPO I (CONTROL): El grupo control (n=6) consistió en tejido omental procedente de animales no sometidos a procedimiento quirúrgico previo.

De manera complementaria, y con la intención de estudiar el efecto que produce la colocación de un biomaterial en la cavidad peritoneal sobre el omentum a través de la secreción de factores al fluido peritoneal, se realizaron estudios histológicos e inmunohistoquímicos con tejido omental (n=6) no involucrado en la formación adherencial y procedente de zonas alejadas de la prótesis en animales sometidos al implante de la malla. Este análisis nos permitió observar la influencia del ambiente inflamatorio rico en factores de crecimiento y citocinas creado como consecuencia del implante protésico sobre la composición y morfología del tejido omental.

GRUPO II: Constituido por tejido adherencial formado entre la prótesis de polipropileno y el omentum de los animales. Los tiempos de estudio fueron 3 (n=6), 7 (n=6) y 14 (n=6) días post-cirugía.

Se obtuvieron muestras de todos los animales a todos los tiempos para la realización de estudios morfológicos, histológicos, inmunohistoquímicos, de Western blot y RT-PCR sobre el tejido. Se almacenaron fragmentos de estas muestras para la obtención y estudio de los cultivos celulares descritos en el segundo objetivo.

3.1.1.6 ESTUDIOS MORFOLÓGICOS

a) Microscopía óptica

Las muestras fueron sumergidas en MEM y transportadas hasta el laboratorio, donde se fijaron con una solución de formol al 10% en agua destilada, líquido de Bouin, solución F13 o mediante fijación por congelación a -80° C, dependiendo de las técnicas a realizar posteriormente.

Una vez transcurridos los periodos de tiempo establecidos para la correcta fijación de las muestras, éstas fueron deshidratadas e incluidas en parafina siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

Agua destilada.....	20 minutos
Alcohol 70%.....	20 minutos
Alcohol 96%.....	30 minutos
Alcohol 100%.....	60 minutos (3x20 min.)
Alcohol 100%-Acetato n-butilo (1:1)	15 minutos
Acetato n-butilo	20 minutos (2x10 min.)
Acetato n-butilo-Parafina (1:1)	20 minutos
Parafina	5 horas

Los dos últimos pasos, en los que se emplea parafina, se realizaron en una estufa a 60°C. Una vez finalizada la inclusión, se realizaron bloques mediante la utilización de barras de Leuckart, en cuyo interior se había vertido parafina fundida a 60° C e introducido las muestras para, una vez solidificada la parafina, proceder a su microtomía con un microtomo rotatorio MICROM HM-325. Se obtuvieron cortes de 5 µm de espesor que fueron estirados en un baño de agua caliente y recogidos en portaobjetos impregnados con una solución de poli-lisina al 10% en agua destilada para facilitar la adhesión de las muestras al vidrio.

Una vez secos, los cortes se desparafinaron con xilol (30 minutos) y se rehidrataron con alcoholes de concentración decreciente: etanol 100% (10 minutos),

etanol 96% (10 minutos), etanol 70% (10 minutos), hasta obtener su rehidratación completa con agua. Los cortes se destinaron a estudios histológicos e inmunohistoquímicos, según los procedimientos descritos posteriormente. Las muestras fijadas por congelación fueron incluidas en Tissue-Tek O.C.T compound (Sakura Finetek, USA) y cortadas en un criostato (Leica CM1850) en secciones de 5 µm de espesor que fueron almacenadas a -20 °C hasta el momento de su procesado.

Para los estudios histológicos, los cortes fueron teñidos con diferentes técnicas para la observación de los diversos componentes tisulares: hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson (variante de Goldner-Gabe), orceína, rojo Sirio y hematoxilina ácida fosfotúngstica (PTAH) para la observación de fibrina. La observación de las muestras se realizó en un microscopio óptico Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Tinciones:

Hematoxilina-eosina

- Tinción con hematoxilina de Carazzi durante 20 minutos.
- Lavado con agua corriente durante 10 minutos para el viraje de la hematoxilina.
- Tinción con eosina alcohólica durante 3 minutos.
- Lavado de los cortes en agua.
- Deshidratación en alcohol al 96% durante 5 minutos.
- Deshidratación en alcohol al 100% durante 5 minutos.
- Aclaramiento en xilol durante 10 minutos.
- Montaje con Bálsamo de Canadá.

Tricrómico de Masson

- Tinción con hematoxilina de Carazzi durante 20 minutos.
- Lavado con agua corriente durante 10 minutos.
- Tinción con fucsina durante 10 minutos.
- Lavado rápido en agua acética al 1%.
- Tinción con orange G durante 10 minutos.

- Lavado rápido en agua acética al 1%.
- Tinción con verde luz durante 10 minutos.
- Lavado con agua con unas gotas de alcohol al 96%.
- Deshidratación en alcohol al 96% durante 2 minutos.
- Deshidratación en alcohol al 100% durante 5 minutos.
- Aclaramiento en xilol durante 10 minutos.
- Montaje con Bálsamo de Canadá.

Orceína

- Tinción con orceína alcohólica durante 30 minutos.
- Lavado con agua destilada durante 30 minutos.
- Sumergir en alcohol al 96% durante 5 minutos.
- Sumergir en alcohol al 100% durante 15 minutos.
- Decoloración del fondo con alcohol ácido, 2-10 minutos.
- Lavado con agua durante 10 minutos.
- Contraste con hematoxilina de Carazzi durante 20 minutos.
- Lavado en agua corriente durante 10 minutos.
- Deshidratación en alcohol al 96% durante 5 minutos.
- Deshidratación en alcohol al 100% durante 5 minutos.
- Aclaramiento en xilol durante 10 minutos.
- Montaje con Bálsamo de Canadá.

Rojo Sirio

- Tinción con rojo Sirio 30 minutos.
- Lavado con ácido clorhídrico 0,01N durante 10 minutos.
- Tinción con hematoxilina de Weigert 10 minutos.
- Lavado con agua corriente.
- Deshidratación rápida en alcohol al 100%.
- Aclaramiento de los cortes en xilol y montaje con Bálsamo de Canadá.

Esta técnica nos permite distinguir entre el colágeno inmaduro (colágeno tipo III), que aparece en tonos amarillo-verdosos, y el colágeno maduro (colágeno tipo I), en tonos

rojizos cuando se realiza la observación con luz polarizada. La técnica se basa en la interacción y orientación entre los grupos sulfónicos del colorante con los grupos amino de la lisina e hidroxilisina y los grupos guanidina de la arginina de las fibras de colágeno, que dan lugar a coloraciones diferentes en función del grado de maduración del colágeno.

PTAH (tinción para fibrina)

- Tinción en lugol al 50% hasta que los cortes adquieran un color amarillo-marrón.
- Se elimina el exceso de yodo y se lava con hiposulfito potásico al 0.5%.
- Lavado con agua destilada durante 5 minutos.
- Introducir en una solución de tiosulfato sódico al 5% durante 3 minutos.
- Lavado con agua destilada.
- Introducir en una solución de ácido oxálico durante 1 minuto.
- Lavado con agua destilada.
- Tinción con hematoxilina ácida fosfotúngstica durante 2 horas a 60°C.

La hematoxilina ácida fosfotúngstica se preparó de la siguiente manera:

- Disolver 1 g de hematoxilina en 300 mL de agua destilada y calentar ligeramente.
- Disolver 20 g de ácido fosfotúngstico en 700 mL de agua destilada.
- Mezclar las dos soluciones cuando ambas estén frías.
- Se puede acelerar la maduración añadiendo 0.177g de permanganato potásico y 2 mL de peróxido de hidrógeno al 3%. Dejar reposar durante 3 días antes de su utilización.
- Deshidratación: 2 pases de 1 minuto en alcohol de 96° y 2 pases de 1 minuto en alcohol absoluto.
- Aclaramiento en xilol y montaje con Bálsamo de Canadá.

Esta técnica nos permitió la identificación de la fibrina, que aparece en color azul oscuro. Los núcleos, citoplasmas, hematíes y fibrillas aparecen en azul pálido o morado, mientras que el colágeno aparece en tonos rojizos.

b) Microscopía electrónica de transmisión

Para el estudio a microscopía electrónica se tomaron pequeñas secciones de tejido adherencial de los diferentes tiempos de estudio y de tejido del omentum control.

Como fijador se utilizó glutaraldehído al 3%. Las piezas se mantuvieron en él entre una y dos horas. Posteriormente, se realizó el lavado de las piezas en tampón lavador Milloning durante dos horas. El proceso de inclusión se realizó durante tres días consecutivos según el protocolo descrito a continuación:

-Primer día:

Post-fijación con tetraóxido de osmio al 1% en tampón Milloning con calcio durante una hora y lavado rápido en agua destilada. Una vez preparadas las piezas, se procedió a su deshidratación con acetonas de concentraciones crecientes:

Acetona 30%	15 minutos
Acetona 50%	30 minutos
Acetona 70%	30 minutos
Acetona 70% + acetato de uranilo	12-18 horas a 4°C

-Segundo día:

Se continuó la deshidratación de las muestras:

Acetona 90%	30 minutos (2x15 min.)
Acetona 100%	30 minutos (2x15 min.)
Acetona 100% + sulfato de cobre	40 minutos (2x20 min.)

Tras la deshidratación, se llevó a cabo la inclusión de las muestras en una resina sintética denominada araldita, de la siguiente manera:

Óxido de propileno	40 minutos (2x20 min.)
Óxido de propileno + Araldita I (3:1)	30 minutos
Óxido de propileno + Araldita I (2:2)	2 horas
Óxido de propileno + Araldita I (1:3)	2 horas
Araldita I.....	12-18 horas a 40°C

-Tercer día:

Araldita I..... 1 hora a 40°C
Araldita II..... 30 minutos a 40°C
Araldita II.....45 minutos a 40°C

Por último, se procedió al llenado de los moldes de inclusión con araldita II y se orientaron las piezas. Los moldes permanecieron en una estufa a 70° C durante 48 horas para que la araldita polimerizase.

Una vez obtenidos los bloques, se realizaron cortes semifinos con un ultramicrotomo (Ultracut REIGHERT-JUNG) a una micra de espesor que fueron teñidos con azul de Toluidina. Establecida la zona de interés a estudiar, se procedió al tallado de los bloques en una talladora (Creighert-TM 60), para posteriormente efectuar cortes ultrafinos de 60 nanómetros de espesor. Estos cortes fueron recogidos en rejillas de cobre cubiertas con una membrana de resina Formvar y contrastados con citrato de plomo durante cuatro minutos. Una vez lavados y secos, la observación de los cortes se realizó en un microscopio electrónico de transmisión (Zeiss M10).

3.1.1.7 ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Las muestras destinadas a estudios inmunohistoquímicos fueron procesadas de la misma manera que para los estudios de microscopía óptica: una vez incluidas en parafina y seccionadas por microtomía en secciones de 5 µm de espesor, se realizó su desparafinado e hidratación.

a) Inmunohistoquímica (fosfatasa alcalina)

La detección de la reacción antígeno-anticuerpo se realizó por el método de la avidina-biotina usando como trazador la fosfatasa alcalina según el protocolo siguiente:

- Lavado de las muestras con PBS (pH=7,4), tres pases de 5 minutos.
- Bloqueo de las zonas de unión inespecíficas con BSA (albúmina sérica bovina) al 4% en PBS (pH=7,4), durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Incubación con el anticuerpo primario (según especificaciones de la casa comercial) diluido en BSA 4% en PBS durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C.
- Lavado con PBS-BSA 0,5%, tres pases de 5 minutos.

- Incubación con el anticuerpo secundario biotinado diluido en PBS. Se realiza durante 60 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- Lavado con PBS, tres pases de 5 minutos.
- Incubación con el complejo Extreptavidina[®]-Fosfatasa alcalina (1:200), durante 60 minutos a temperatura ambiente.
- Lavado en PBS, tres pases de 5 minutos.
- Revelado con el sustrato cromogénico durante 15 minutos (controlando la aparición de marcaje bajo el microscopio). La preparación del sustrato cromogénico se realizó inmediatamente antes del revelado añadiendo a 10 mL de PBS:
 - 10 mg de α -naftol AS-BI fosfato
 - 10 mg de Fast red
 - 100 μ l de levamisole 0.1 M

Cada uno de los componentes se añadió en el orden indicado y mezclando bien tras la adición de cada uno de ellos. Finalmente, se filtró la mezcla y se añadió inmediatamente sobre el tejido. Esta técnica nos permite obtener un marcaje en rojo intenso.

- Lavado con agua destilada, tres pases de 5 minutos.
- Tinción de los núcleos celulares con hematoxilina de Carazzi, durante 15 minutos.
- Lavado en agua corriente durante 10 minutos.
- Montaje en medio acuoso con Plasdon.

En todos los casos, se utilizó como control negativo el mismo material biológico al que no se le había añadido anticuerpo primario, siendo éste sustituido por tampón lavador (PBS). La visualización del marcaje se realizó en un microscopio óptico Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

La cantidad de células positivas para un marcador determinado se realizó mediante el recuento en 40 campos elegidos al azar (400x) y se expresó como el porcentaje de células marcadas con respecto al número de células totales.

b) Inmunohistoquímica (peroxidasa)

En este caso, la detección de la reacción antígeno-anticuerpo se realizó por el método de la peroxidasa según el protocolo siguiente:

- Bloqueo de la peroxidasa endógena con H_2O_2 30%/ metanol (1:9) en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Lavado de las muestras con PBS (pH=7,4), tres pases de 5 minutos.
- Bloqueo de las zonas de unión inespecíficas con BSA (albúmina sérica bovina) al 4% en PBS (pH=7,4), durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Incubación con el anticuerpo primario (según especificaciones de la casa comercial) diluido en BSA 4% en PBS durante toda la noche a 4°C.
- Lavado con PBS, tres pases de 5 minutos.
- Incubación con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavado con PBS, tres pases de 5 minutos.
- Revelado mediante incubación con el sustrato cromogénico diaminobencidina (Kit DAB, SK-4100, Vector) durante 5 minutos.

La preparación del sustrato cromogénico se realizó inmediatamente antes de proceder al revelado añadiendo a 5 mL de agua destilada:

- 2 gotas de buffer
- 4 gotas de DAB
- 2 gotas de agua oxigenada

Se filtró la solución y se incubaron las muestras con ella. Esta técnica nos permitió obtener un marcaje en color marrón.

- Lavado con agua destilada, 3 pases de 5 minutos.
- Contrastado de los núcleos mediante tinción con hematoxilina de Carazzi durante 15 minutos.
- Lavado en agua corriente durante 10 minutos
- Montaje en medio acuoso con plasdona

En todos los casos, se utilizó como control negativo el mismo material biológico al que no se le había añadido anticuerpo primario, siendo éste sustituido por tampón

lavador (PBS). La visualización del marcaje se realizó en un microscopio óptico Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). La cantidad de células positivas para un marcador determinado se realizó mediante el conteo en 40 campos elegidos al azar (400x) y se expresó como el porcentaje de células marcadas con respecto al número de células totales.

c) Inmunofluorescencia

Para los estudios por inmunofluorescencia en tejido se emplearon las muestras que habían sido fijadas mediante congelación, incluidas en Tissue-Tek O.C.T compound (Sakura Finetek, USA) y cortadas en un criostato (Leica CM1850) en secciones de 5 μ m de espesor para ser posteriormente almacenadas a -20 °C.

- Se dejaron atemperar las muestras durante 5 minutos y se realizaron 3 lavados de 5 minutos con 0.1% Tween 20 en PBS 1X.
- Para eliminar la autofluorescencia que puedan presentar las muestras se trataron éstas con NH_4Cl (50mM diluido en PBS pH=8.0) durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con 0.1% Tween 20 en PBS 1X.
- Incubación con el tampón de bloqueo 0.1% Tritón X-100/1% BSA/ 10% FBS durante 45 minutos a temperatura ambiente.
- Incubación con el anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo a la dilución adecuada (según especificaciones de la casa comercial) durante toda la noche a 4°C.
- Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con 0.1% Tween 20 en PBS 1X.
- Incubación con el anticuerpo secundario unido a FITC o a Rodamina durante 1 hora a 37°C.
- Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con 0.1% Tween 20 en PBS 1X.
- Se contrastaron los núcleos celulares con DAPI.
- Se realizaron 3 lavados de 5 minutos en PBS 1X.
- Montaje de los muestras con el medio de montaje FluorSave™ Reagent (Calbiochem, USA).

Las secciones fueron examinadas con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) o con un microscopio confocal (Leica TCS-SP5).

Los anticuerpos primarios empleados en las técnicas inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia se resumen en las siguientes tablas:

Anticuerpo	Especificidad	Clon	Dilución	Proveedor
α -actina de músculo liso	Células musculares lisas	1A4	1:400	SIGMA
Desmina	Células musculares	DE-U-10	1:20	SIGMA
Miosina	Células musculares	HSM-V	1:200	SIGMA

Tabla 1: Marcadores musculares.

Anticuerpo	Especificidad	Clon	Dilución	Proveedor
Citoqueratina basal	Reconoce la citoqueratina 5 (entre otras). Marca células basales, población stem y células amplificadoras del tránsito en tejidos epiteliales.	RCK103	1:20	Abcam
Citoqueratina-18	Reconoce células epiteliales glandulares y células mesoteliales	RGE53	1:40	Abcam

Tabla 2: Citoqueratinas.

Anticuerpo	Especificidad	Clon	Dilución	Proveedor
Nanog	Células pluripotentes	–	1:10	R&D Systems
Oct3/4	Células pluripotentes	–	1:10	R&D Systems

Tabla 3: Marcadores de pluripotencialidad.

Anticuerpo	Especificidad	Clon	Dilución	Proveedor
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante β 1	–	1:1000	Chemicon
LAP-TGF β 1	Péptido asociado a la latencia del TGF β 1	–	1:20	R&D Systems
TGF- β 3	Factor de crecimiento transformante β 3	–	1:50	SIGMA
Betaglicano	Receptor tipo III del TGF- β (TGF- β RIII)	–	1:50	SIGMA

Tabla 4: Factor de crecimiento transformante β .

Anticuerpo	Especificidad	Clon	Dilución	Proveedor
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular	JH121	1:50	Abcam
PECAM-1 (CD31)	Marcador específico de endotelio	WM-59	1:100	Sigma

Tabla 5: Marcadores de endotelio.

Anticuerpo	Especificidad	Clon	Dilución	Proveedor
Colágeno I	Colágeno tipo 1	COL-1	1:500	Sigma
Anti-hCl (III)	Colágeno tipo 3	III-53	1:500	Medicorp

Tabla 6: Colágenos.

Anticuerpo	Especificidad	Clon	Dilución	Proveedor
RAM-11	Macrófagos de conejo activados	–	1:50	Dako
CD4	Linfocitos T CD4 activados	KEN-4	1:30	Antigenix America
CD8	Linfocitos T CD8 activados	C7	1:10	Antigenix America
Linfocitos B	Linfocitos B activados	NRBM	1:50	Antigenix America
Triptasa mastocítica	Células mastocíticas activadas	AA1	1:100	Abcam

Tabla 7: Células inflamatorias.

3.1.1.8 WESTERN BLOTTING

3.1.1.8.1 Extracción de proteínas a partir de tejido

Se almacenaron muestras de tejido adherencial y de omentum control a -80°C hasta el momento de su procesamiento. La extracción de proteínas totales se llevó a cabo mediante la disección de muestras de tejido de aproximadamente 1 cm^2 con ayuda de dos bisturíes. Los fragmentos se llevaron a un eppendorf que contenía $500\text{ }\mu\text{L}$ de tampón de homogeneización, donde fueron disgregados con ayuda de un émbolo de manera que se obtuvo una solución homogénea. Todo el proceso se llevó a cabo en hielo. La solución obtenida se centrifugó a 12000 g durante 20 minutos. El sobrenadante, conteniendo las proteínas, se recogió en eppendorf nuevos y el pellet se desechó.

Composición del tampón de homogeneización:

- 50mM Tris HCl
- 1% Tritón X-100
- 200mM NaCl
- 10mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{ H}_2\text{O}$

Se ajustó el pH=7,6 y se añadió un 8% (v/v) de inhibidores de proteasas 25X (Roche, Penzberg, Alemania).

3.1.1.8.2 Determinación de la concentración proteica

La determinación de la concentración proteica para las diferentes muestras se llevó a cabo mediante el método de Bradford. Este método consiste en la adhesión de las proteínas al azul brillante G-250 Coomassie que contiene el líquido de Bradford (Bio-Rad Protein Assay), de tal forma que la unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 nm a 595 nm. Así el colorante torna su color de rojizo a azulado a medida que aumenta la concentración proteica.

La preparación de la recta patrón y las diferentes muestras se realizó tal y como se indica en la **tabla 8**. Se mezclaron bien todos los componentes y se leyó la absorbancia a 595 nm, ya que es a esta longitud de onda cuando el cambio en la absorbancia es proporcional a la concentración de proteína de la muestra.

Una vez medida la absorbancia de todos los tubos y conocida la cantidad de proteína de cada uno de los puntos de la recta patrón pudimos extrapolar a partir de ella la concentración de proteína para cada una de las muestras. Esto nos permitió preparar todas las muestras a una misma concentración previamente a su utilización en la técnica de Western blot.

Tubos	Estándar BSA (1 mg/ mL)	Muestra	NaOH 0,1 M	Agua bidestilada	Líquido de Bradford
1 y 2 (Blanco)	0 µL	0 µL	20 µL	780 µL	200 µL
3 y 4	5 µL	0 µL	20 µL	775 µL	200 µL
5 y 6	10 µL	0 µL	20 µL	770 µL	200 µL
7 y 8	15 µL	0 µL	20 µL	765 µL	200 µL
9 y 10	20 µL	0 µL	20 µL	760 µL	200 µL
Muestras	0 µL	5 µL	20 µL	775 µL	200 µL

Tabla 8: Indicaciones para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

3.1.1.8.3 *Electroforesis*

Todas las muestras fueron diluidas a una concentración de 1.5 µg de proteína/µL con tampón de homogeneización y se les añadió un 20% (v/v) de tampón de muestra 5X (Tris 50mM pH=6.8; Glicerol 50%; SDS 15%; β-mercaptoetanol 25%; agua bidestilada 20%; Azul de bromofenol 0.125%). Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento.

Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) en condiciones reductoras.

Para la preparación de los minigeles se utilizaron los siguientes reactivos:

- Solución Acrilamida 40%/Bisacrilamida 1.5% (Amresco, Solon, OH)
- Tampón concentrador 4x (Tris 0.5M pH=6.8, SDS 0.4%).
- Tampón separador 4X (Tris 1.5M pH=8.8, SDS 0.4%).
- Persulfato amónico (Amresco), 100mg/mL
- TEMED (Amresco)
- Agua bidestilada

El gel separador se preparó al 10%: 3.75mL de la solución Acrilamida /Bisacrilamida+ 3.75 mL de tampón separador 4X + 7.5 mL de agua bidestilada + 0.090 mL de persulfato amónico 100mg/mL + 0.045 mL de TEMED.

Se mezclaron todos los componentes de manera homogénea, evitando la formación de burbujas, y se añadió cantidad suficiente para formar los minigeles a la cubeta de polimerización, dejando 1.5 cm hasta el borde superior para el gel concentrador. La polimerización se realizó en 30-40 minutos en ausencia de oxígeno, para lo cual el gel se cubrió con agua. Transcurrido este tiempo, se eliminó el agua mediante inversión de la cubeta de polimerización y secado con papel absorbente. Posteriormente, se procedió a la adición del gel concentrador sobre el gel separador ya polimerizado.

El gel concentrador se preparó al 4%: 0.5 mL de la solución de Acrilamida/Bisacrilamida + 1.25 mL de tampón concentrador 4X + 3.25 mL de agua bidestilada + 0.030 mL de persulfato amónico 100mg/mg + 0.015 mL de TEMED.

Se dejó polimerizar durante 40-60 minutos con los peines introducidos. Transcurrido este tiempo se quitaron los peines y se llevaron los geles a la cubeta de

electroforesis, donde se cubrieron con tampón de electroforesis 1X (50mM Tris, 0.4 M Glicina y 0.1% SDS en 1 litro de agua bidestilada, pH= 8.3). Las muestras fueron hervidas durante 5 minutos a 90° C y se cargaron 10 µL (15 µg de proteína) de cada muestra. Así mismo, se cargó un pocillo por cada gel con el marcador de peso molecular (Biorad, Hercules, CA, USA). La electroforesis se desarrolló a 100V durante 2 horas a temperatura ambiente.

3.1.1.8.4 Transferencia

Una vez terminada la electroforesis, los geles se inmovilizaron en contacto con una membrana de nitrocelulosa BioTrace®NT (Pall Corporation, Pensacola, FL, USA) entre papeles de filtro (papel Whatman 3MM) y esponjas, todo ello impregnado en tampón de transferencia 1X (Tris 50mM, Glicina 380mM, SDS 0.1%, metanol 20% en 2 litros de agua bidestilada, pH= 8,3). Este montaje fue llevado a la cubeta de transferencia que contenía tampón de transferencia 1X. El proceso se realizó durante toda la noche a 4°C y 210 mA.

Se realizó la tinción de la membrana con Rojo Ponceau (Ponceau S Extra, Rhône-Poulenc) 0.2% durante 10 minutos para comprobar que la transferencia se había realizado correctamente. La eliminación del colorante se realizó con ácido acético al 5% y posteriores lavados con agua corriente.

3.1.1.8.5 Inmunodetección

Previamente al proceso de inmunodetección, se procedió al lavado de la membrana con el tampón de lavado TBS 1X-Tween 20 0.05% (3 lavados de 5 minutos). El bloqueo de los sitios de unión inespecíficos se realizó con un 5% de leche en polvo en TBS 1X-Tween 20 0.05% durante toda la noche a 4°C. Una vez retirado el tampón de bloqueo se procedió a la incubación de la membrana con el anticuerpo primario (ver **tabla 9**) diluido en tampón de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras lavar la membrana 3 veces durante 5 minutos en tampón de lavado, se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y diluido en TBS 1X durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se realizaron dos lavados de 5 minutos con tampón de lavado y un lavado de 5 minutos con TBS 1X.

Por último, se realizó el revelado mediante quimioluminiscencia incubando la membrana con luminol (Kit Supersignal West Pico Chemiluminiscent Substrate, Pierce, Rockford, Il, U. S. A) durante 5 minutos a temperatura ambiente y exposición en película Amersham Hyperfilm ECL (High Performance chemiluminescence film, GE Healthcare, UK). El revelado de la película se realizó por inmersión en el líquido revelador (Kodak processing chemicals for autorradiography films, GBX developer/replenisher, Sigma), lavado en agua, inmersión en el líquido fijador (Kodak processing chemicals for autorradiography films, GBX fixer/replenisher, Sigma), lavado en agua y secado al aire.

Todas las membranas fueron incubadas con el anticuerpo anti-mouse β -actina (Calbiochem, Inc., La Jolla, Calif., USA) como control de carga. Las intensidades de las bandas se cuantificaron mediante densitometría utilizando el programa Image J de procesamiento de imágenes (The National Institutes of Health, USA). Las intensidades de las bandas para los diferentes anticuerpos fueron normalizadas con la intensidad de las bandas de la β -actina.

Anticuerpo	Especificidad	Clon	Dilución	Proveedor
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante β	–	1:1000	Chemicon
LAP-TGF β 1	Péptido asociado a la latencia del TGF- β	–	1:20	R&D Systems
β -actina (JLA 20)	Utilizado como control de carga para la normalización de las bandas	JLA-20	1:2000	Calbiochem

Tabla 9: Anticuerpos primarios empleados en la técnica Western blot

3.1.1.9 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL

3.1.1.9.1 Extracción de RNA

Para la extracción de RNA, se emplearon fragmentos de, aproximadamente, 0,25 cm² del tejido adherencial obtenido a 3, 7, 14 y 90 días post-cirugía. Como tejido control, se utilizaron fragmentos de omentum pertenecientes a animales sanos no sometidos a cirugía previa. Los fragmentos de tejido recogidos fueron inmediatamente sumergidos en una solución de RNA later (Ambion, Austin, TX, USA) con el fin de mantener la

integridad de éste. Las muestras se almacenaron a -80° C hasta el momento de su utilización.

La extracción de RNA se llevó a cabo mediante el método del isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo de Chomczynski y Sacchi (1987). Para ello, las muestras de tejido se disgregaron con ayuda de dos bisturíes sobre placas Petri en un recipiente con hielo. Estos fragmentos de tejido se llevaron a un tubo eppendorf estéril que contenía 1 mL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El tejido se homogeneizó con ayuda de un émbolo estéril.

La solución resultante se centrifugó durante 10 minutos a 12000 g y 4° C con el fin de eliminar el contenido de grasa que quedaba en la capa superior. El pellet que contenía los restos de tejido también se desechó y la solución restante se llevó a un tubo eppendorf limpio y estéril, donde se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Se añadieron 200 µL de cloroformo a temperatura ambiente y se mezcló durante 15 segundos por inversión del tubo eppendorf. Se realizó una incubación durante 2-3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 14000g durante 20 minutos y 4°C para obtener dos fases separadas por una interfase: una fase inferior orgánica de color rosa que contiene el DNA y proteínas y una fase superior acuosa e incolora que contiene el RNA. La fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf limpio y estéril que contenía 500 µL de isopropanol frío. Se mezclaron ambas soluciones por inversión y se dejó precipitar a 4° C durante toda la noche.

Posteriormente, se realizó una incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a 14000 g durante 20 minutos a 4° C. El RNA precipitado se observó como un pellet gelatinoso. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet de RNA con 1 mL de etanol 75°. Se centrifugó a 14000g durante 10 minutos a 4° C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente en hielo durante 15-20 minutos. Por último, se rehidrató el RNA con 20 µL de agua libre de RNAsas mediante incubación durante 10 minutos en un baño a 65°C.

La integridad del RNA extraído fue comprobada a través de un gel de agarosa al 1% que contenía 7 µL de SYBR Green II RNA gel stain (10 000X concentrate in DMSO) (Invitrogen). Se mezclaron 2 µL de RNA con 8 µL de agua libre de RNAsas y 2 µL de BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), que contiene azul de

bromofenol. La electroforesis se llevó a cabo a 80V durante unos 50 minutos. La observación de las bandas se realizó con ayuda de un transiluminador y se desecharon aquellas muestras que mostraban degradación del RNA.

La concentración de cada muestra fue cuantificada midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 3100 Pro (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Una vez conocida la concentración de cada muestra, se llevaron todas a una misma concentración de 50 ng/ μ L.

3.1.1.9.2 Transcripción inversa

El cDNA fue sintetizado a partir de 500 ng de RNA total mediante transcripción inversa. Para ello se mezclaron 10 μ L de RNA (50 ng/ μ L) con 10 μ L de mix RT 2X preparado a partir de los componentes del kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), en las proporciones indicadas a continuación:

- 3.2 μ L de agua libre de RNAsas
- 2 μ L de 10X RT Buffer
- 0.8 μ L de 25X dNTPs
- 2 μ L Random primers
- 1 μ L de Multiscribe Reverse Transcriptase
- 1 μ L de inhibidor de RNAsas

En la primera fase, la reacción se sometió a un ciclo de desnaturalización del RNA a 25°C durante 10 minutos en un termociclador. Posteriormente se sometió a un ciclo de síntesis del cDNA a 37° C durante 2 horas. Finalmente, se realizó un ciclo de desnaturalización de la enzima a 85° C durante 5 segundos. El cDNA obtenido durante el proceso de la transcripción reversa fue diluido a razón de 1:20 y almacenado a -80° C.

3.1.1.9.3 RT-PCR

La RT-PCR se llevó a cabo para amplificar los DNA específicos de VEGF, TGF- β 1, colágeno I y colágeno III. Cada muestra fue ensayada por triplicado. Para normalizar los resultados, se utilizó el gen constitutivo gliceraldehído 3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH). Las secuencias de los cebadores o primers pueden encontrarse en la **tabla 10**.

Para la RT-PCR se emplearon 5 μ l del cDNA diluido 1:20 sobre el que se añadieron 10 μ l de iQ SYBR Green Supermix (Bio-rad, Laboratories, Hercules, CA, USA), 1 μ l de cada cebador o primer (sense y antisense a una concentración 6 μ M) y 3 μ L de agua libre de RNAsas para completar la reacción a un volumen total de 20 μ L. La reacción se llevó a cabo en un equipo FAST 7500 de PCR cuantitativa a tiempo real de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Las muestras se sometieron a las siguientes condiciones:

1. Etapa de activación de la enzima a 95° C durante 10 minutos
2. 40 ciclos de:
 - Desnaturalización a 95° C durante 15 segundos.
 - Etapa de unión de los cebadores a la temperatura de fusión (T_m) indicada para cada par de cebadores (sentido y antisentido) (ver **tabla 10**) durante 30 segundos.
 - Extensión a 72° C durante 1 minuto

La detección de la fluorescencia se realizó al final de cada uno de los ciclos. La expresión génica fue normalizada con la expresión del gen de referencia para GAPDH.

Para comprobar la presencia de un único producto de PCR se realizó un gel de agarosa al 2% (SeaKem[®] GTG[®] Agarose, Cambrex, Rockland, ME, USA) en tampón TBE 1X, al que se añadieron 7 μ L de SYBR Green.

Cebador	Secuencia (5'-3')		Tm	Tamaño
VEGF	Sense	GGA GTA CCC TGA TGA GAT CGA	60° C	211 pb
	Antisense	CTT TGG TCT GCA TTC ACA TTT GT		
TGFβ1	Sense	CGG CAG CTG TAC ATT GAC TT	60° C	271 pb
	Antisense	AGC GCA CGA TCA TGT TGG AC		
Colágeno I	Sense	GAT GCG TTC CAG TTC GAG TA	60° C	312 pb
	Antisense	GGT CTT CCG GTG GTC TTG TA		
Colágeno III	Sense	TTA TAA ACC AAC CTC TTC CT	60° C	255 pb
	Antisense	TAT TAT AGC ACC ATT GAG AC		
GAPDH	Sense	TCA CCA TCT TCC AGG AGC GA	55° C	293 pb
	Antisense	CAC AAT GCC GAA GTG GTC GT		

Tabla 10: Cebadores empleados en la RT-PCR.

3.1.1.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se empleó el programa GraphPad Prism 4 para Windows XP.

Cuando los datos seguían una distribución normal, se aplicó el test de la t de Student. En el caso de que los datos no se ajustaran a una distribución normal, se aplicó el test de la U de Mann Whitney para datos no pareados.

Los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar de la población. La significación se estableció en $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,005$ (***).

3.1.2 RESULTADOS

3.1.2.1 ANÁLISIS MACROSCÓPICO

El omentum mostró dos tipos de tejido macroscópicamente diferentes: zonas formadas por tejido adiposo muy vascularizado, y zonas compuestas de una membrana fina y translúcida que surgía como continuación de la lámina mesotelial que englobaba los lóbulos adiposos (**figura 10**). Así, ambas zonas conformaban una estructura única y continua.

Se encontraron adherencias, en mayor o menor medida, en todos los animales y a todos los tiempos de estudio. En todas las adherencias se encontraba involucrado el omentum, mientras que de forma minoritaria se encontraban adherencias entre la malla y las asas intestinales o las vísceras, generalmente el hígado. Se observaron adherencias a partir de los dos tipos de tejido del omentum ya descritos (**figura 10**).

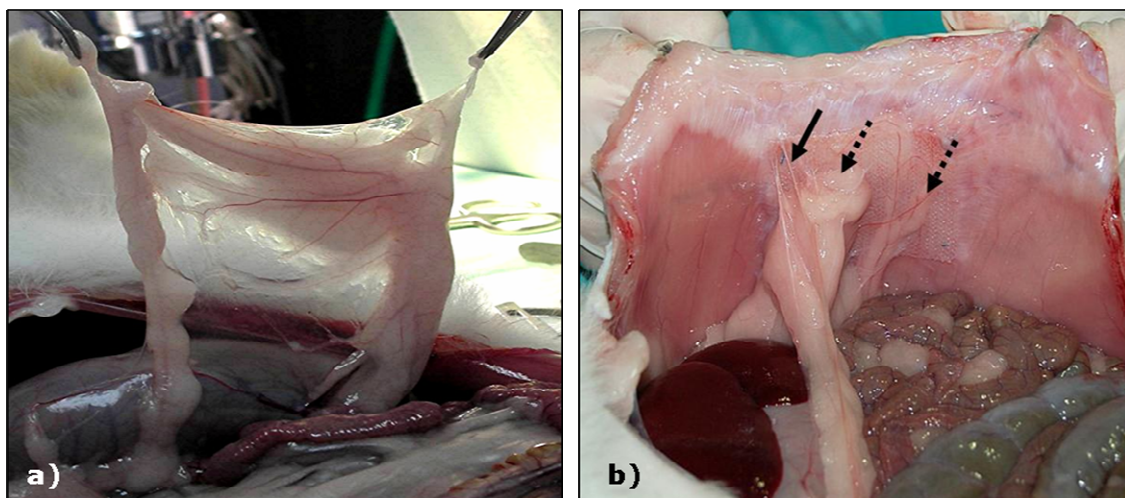


Figura 10: Vista macroscópica del omentum (a) y las adherencias formadas 7 días post-implante (b). Se observaron adherencias formadas a partir del tejido adiposo (flecha punteada) y a partir de la membrana translúcida (→).

3.1.2.2 ESTUDIOS MORFOLÓGICOS

3.1.2.2.1 *Omentum*

Histológicamente, se distinguían en el omentum los dos tipos de tejido observados macroscópicamente: las zonas de tejido adiposo y la membrana translúcida. El

omentum estaba compuesto, fundamentalmente, por tejido adiposo blanco maduro (**figuras 11 y 12**) y bien diferenciado, con elevada vascularización e inervación en toda su superficie. Presentaba una conformación lobular septada por finos tabiques conjuntivos y delimitada por una lámina mesotelial positiva para la citoqueratina basal (**figura 13**). La separación entre la capa mesotelial y el tejido conjuntivo adiposo estaba formada por una lámina intermedia o submesotelial, compuesta por un sustrato conjuntivo en el que destacaba la presencia de vasos sanguíneos y linfáticos (**figura 11**), para facilitar el flujo de contenidos fluidos y corpusculares entre la cavidad peritoneal y el sistema linfático. Las zonas de la membrana translúcida estaban formadas por la capa mesotelial que envolvía una fina capa de conjuntivo laxo donde se asentaba la red vascular. Aparecían como una extensión del mesotelio que cubría los lóbulos adiposos.

Se observaba la presencia de glomérulos omentales (GO), cuerpos reactivos característicos de este tipo de tejido (**figura 11**). Dichas estructuras, todavía mal definidas en cuanto a su morfología y función, parecían jugar un importante papel inmune en la respuesta de este órgano ante cualquier tipo de agresión, mostrando la movilización de sus células en el omentum activado. Los GO aparecían en la capa más exterior del omentum, interrumpiendo la continuidad de la lámina mesotelial, o embebidas en el tejido adiposo.

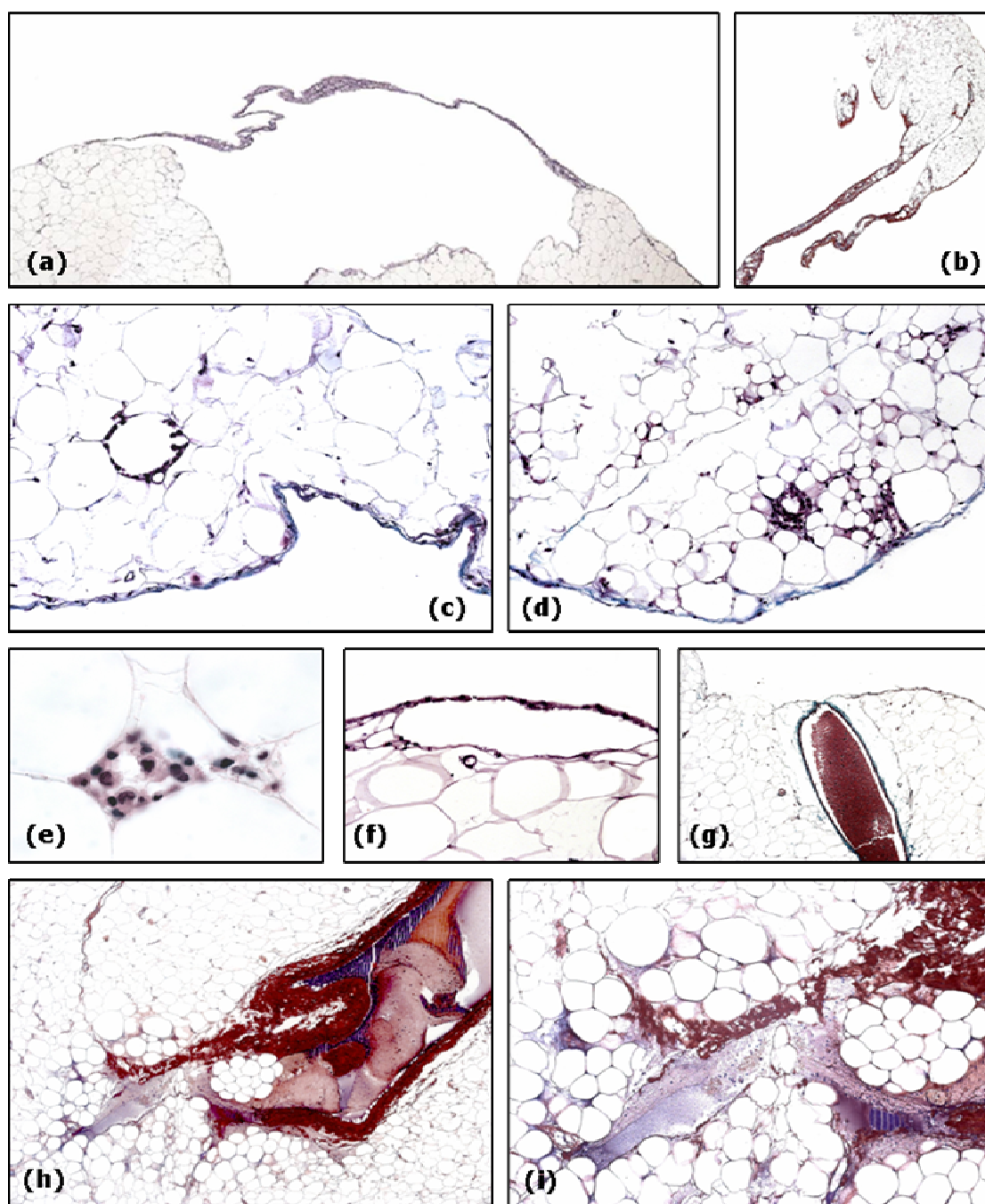


Figura 11: (a) Estructura del omentum (Hematoxilina-eosina, 50x). Se observan dos lóbulos adiposos unidos mediante la extensión del mesotelio que forma la membrana translúcida; (b) La tinción PTAH en el omentum nativo muestra la escasa presencia de fibrina, que tan sólo aparece en el interior de los vasos (50x); (c) Se observa un GO inactivo en el omentum nativo. Se aprecia su asociación con un vaso linfático y la presencia de células inflamatorias (Tricrómico de Masson, 200x); (d) En el caso del omentum activado, se observa la migración de las células inflamatorias a partir de los GO y la colonización del tejido circundante por parte de éstas (Tricrómico de Masson, 200x); (e) Se observan linfocitos y monocitos en el interior de un GO en el omentum nativo (Tricrómico de Masson, 1000x); El omentum muestra un gran número de vasos linfáticos (f) (Hematoxilina-eosina, 400x) y sanguíneos (g) (Tricrómico de Masson, 100x) tanto en el interior del tejido como en el submesotelio; La tinción PTAH en el omentum activado muestra la presencia de fibrina no sólo en el interior de los vasos sino también en el exterior, resultado de la extravasación plasmática en (h) (100x) e (i) (200x).

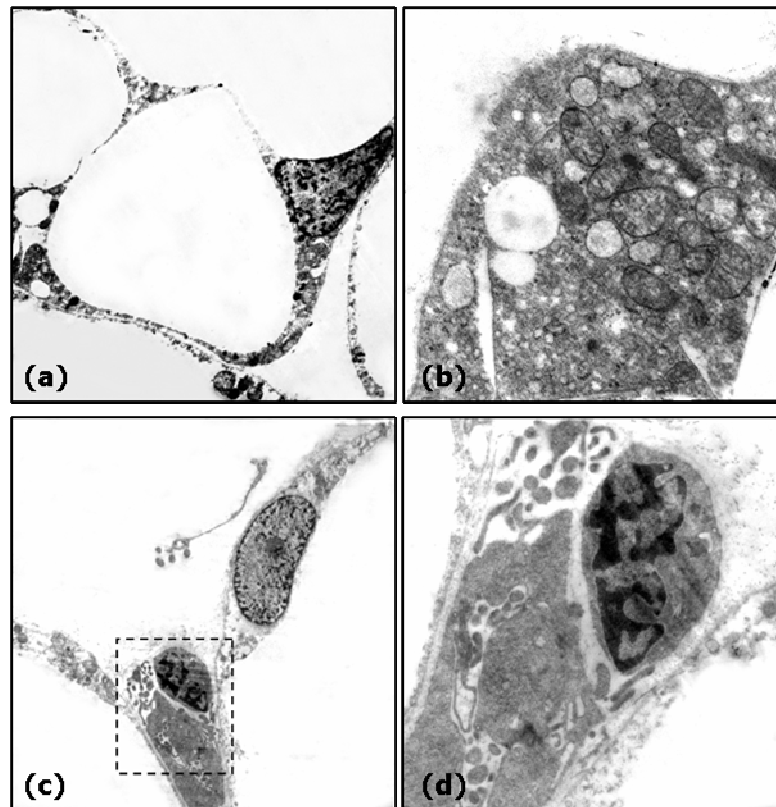


Figura 12: Ultraestructura del omentum. (a) Tejido adiposo blanco maduro del omentum (2500x); (b) El citoplasma de los adipocitos muestra un elevado número de vesículas de secreción y mitocondrias en diferentes estados (10000x); Presencia de un linfocito junto a un linfático (c) 2500x y (d) 8000x.

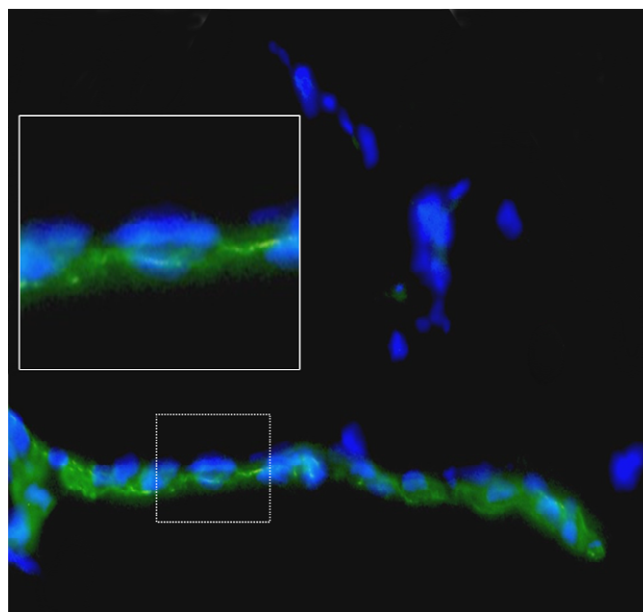


Figura 13: Expresión de citoqueratina basal en el mesotelio del omentum (1000x)

3.1.2.2.2. Tejido adherencial

El examen histológico del tejido adherencial reveló áreas con elevada celularidad y cantidades variables de colágeno intercaladas con áreas de tejido adiposo. En las adherencias de 3 días, si bien se encontraba un engrosamiento de la capa mesotelial y submesotelial además de una intensa proliferación celular a partir de los GO de esta zona, el tejido aparecía compuesto mayoritariamente por tejido adiposo (**figura 14**). Se observaron zonas de regeneración de este tejido con preadipocitos y adipocitos de menor tamaño a los observados en el tejido omental de origen.

En cuanto a las adherencias de 7 y 14 días, se encontraba una gran heterogeneidad en cuanto a su morfología. A pesar de que se apreciaba un aumento importante del componente fibroso en relación a las adherencias de 3 días, la relación entre las cantidades relativas de tejido conectivo/fibroso y tejido adiposo en las adherencias de 7 y 14 días era muy variable.

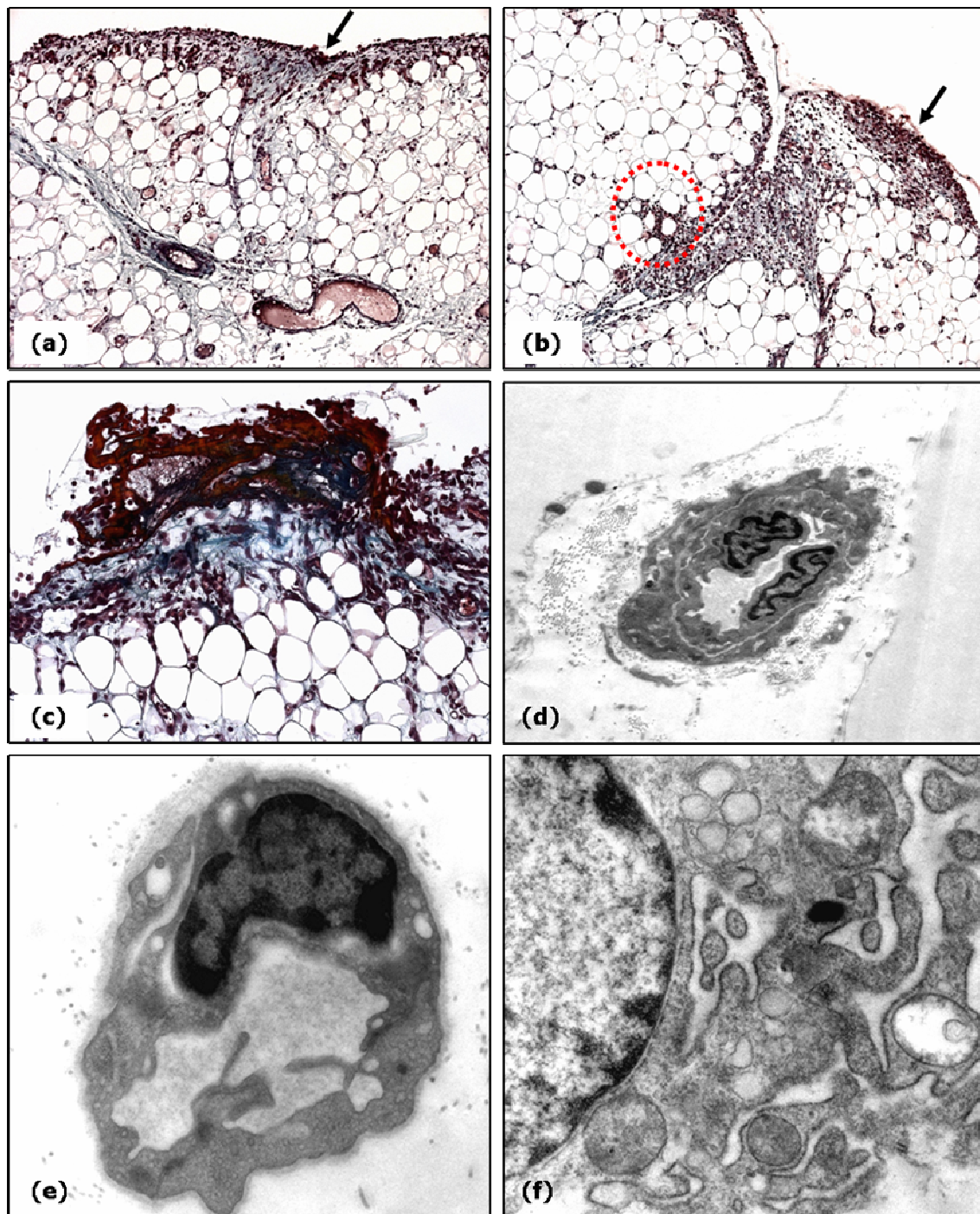


Figura 14: Aspecto histológico (Tricrómico de Masson) (a, b y c) y ultraestructural (d, e y f) de las adherencias de 3 días. Se observa la predominancia el componente adiposo, así como un engrosamiento de las capas mesotelial-submesotelial (→) en (a) y (b) (100x) y la activación de las células de los GO (----) en (b); (c) Restos de un coágulo de fibrina en una zona donde la lámina mesotelial ha sido denudada. Presenta gran cantidad de células blancas en su interior (200x); Presencia de arteriolas (d, 3150x) y capilares (e, 10000x) en el tejido adiposo; f) Se observa la presencia de células muy secretoras con un retículo muy dilatado (10000x).

Las adherencias de 7 días en las que predominaba el componente adiposo mostraban la regeneración por parte de este tejido, de manera similar a lo que ocurría a 3 días (**figura 15**), mientras que aquellas adherencias más fibrosas mostraban un tejido con un claro componente inflamatorio y una matriz sin organizar (**figura 16**).

A 14 días, las células blancas eran minoritarias y las áreas fibrosas mostraban haces de colágeno más compactos. En determinadas zonas, estos haces eran paralelos y estaban alineados, siguiendo el eje de contracción de los miofibroblastos que integraban esas áreas. En las adherencias de componente adiposo se observó la regeneración del tejido (**figura 17**).

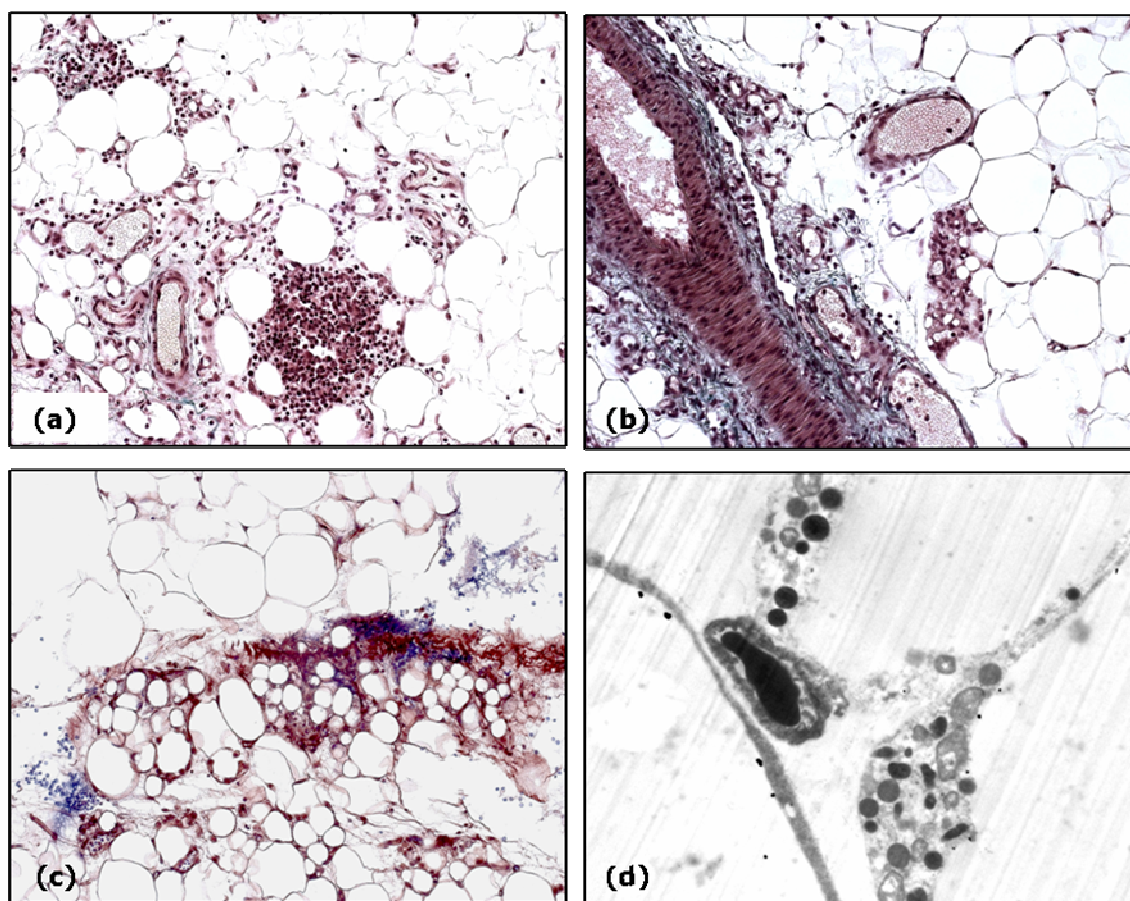


Figura 15: Adherencias de 7 días con predominancia de tejido adiposo. (a) Se observa una elevada proliferación celular por parte de las células inflamatorias procedentes de un GO cercano a un vaso. La posición de las células coincide con la presencia de microvasos. (Tricrómico de Masson, 200x); (b) Zona celular cercana a una arteria en la que se aprecia la generación de pequeños adipocitos (Tricrómico de Masson, 200x); (c) La tinción con PTAH nos mostró que las zonas de generación de adipocitos coincidían con la presencia de fibrina y hematíes (en azul) (200x); (d) La microscopía electrónica de transmisión nos mostró que el tejido adiposo se encontraba irrigado por capilares y que los adipocitos se encontraban muy activos, con un elevado número de lisosomas y mitocondrias en diferentes estados en su citoplasma (2500x).

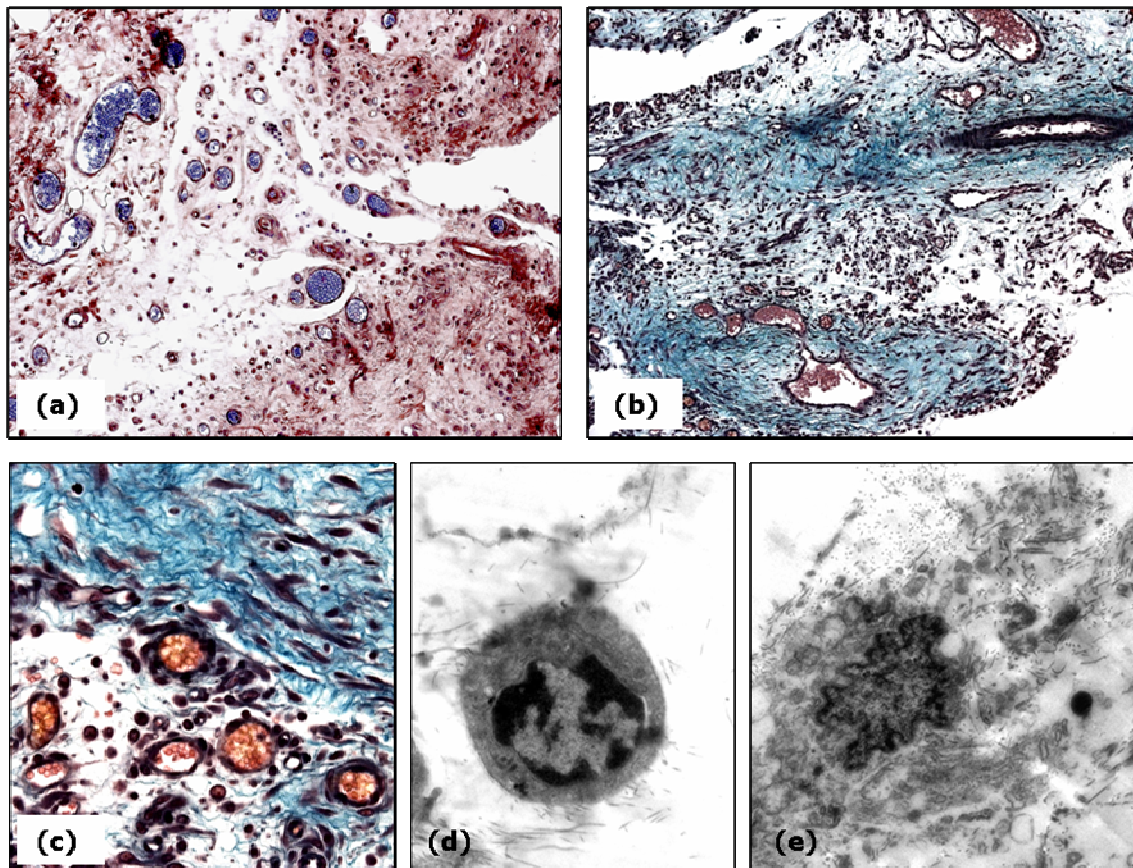


Figura 16: Adherencias de 7 días con predominancia de tejido fibroso. (a) La tinción con PTAH muestra en color azul los hematíes, lo que nos permite apreciar toda la red vascular y la microvasculatura que se genera en aquellas zonas con presencia leucocitaria (200x); (b) Se observa la predominancia de tejido fibroso compuesto principalmente por colágeno, que aparece en color verde (Tricrómico de Masson, 100x); (c) Se observa una zona con microvasos y células blancas inmersas en una matriz laxa y contigua a una zona con depósito de colágeno y células miofibroblastoides (Tricrómico de Masson, 400x); (d) Linfocito adherido a pequeñas fibras de colágeno (6300x); (e) Ultraestructura de una zona fibrosa que muestra una célula con un núcleo escotado inmersa en una matriz amorfa de colágeno (4000x).

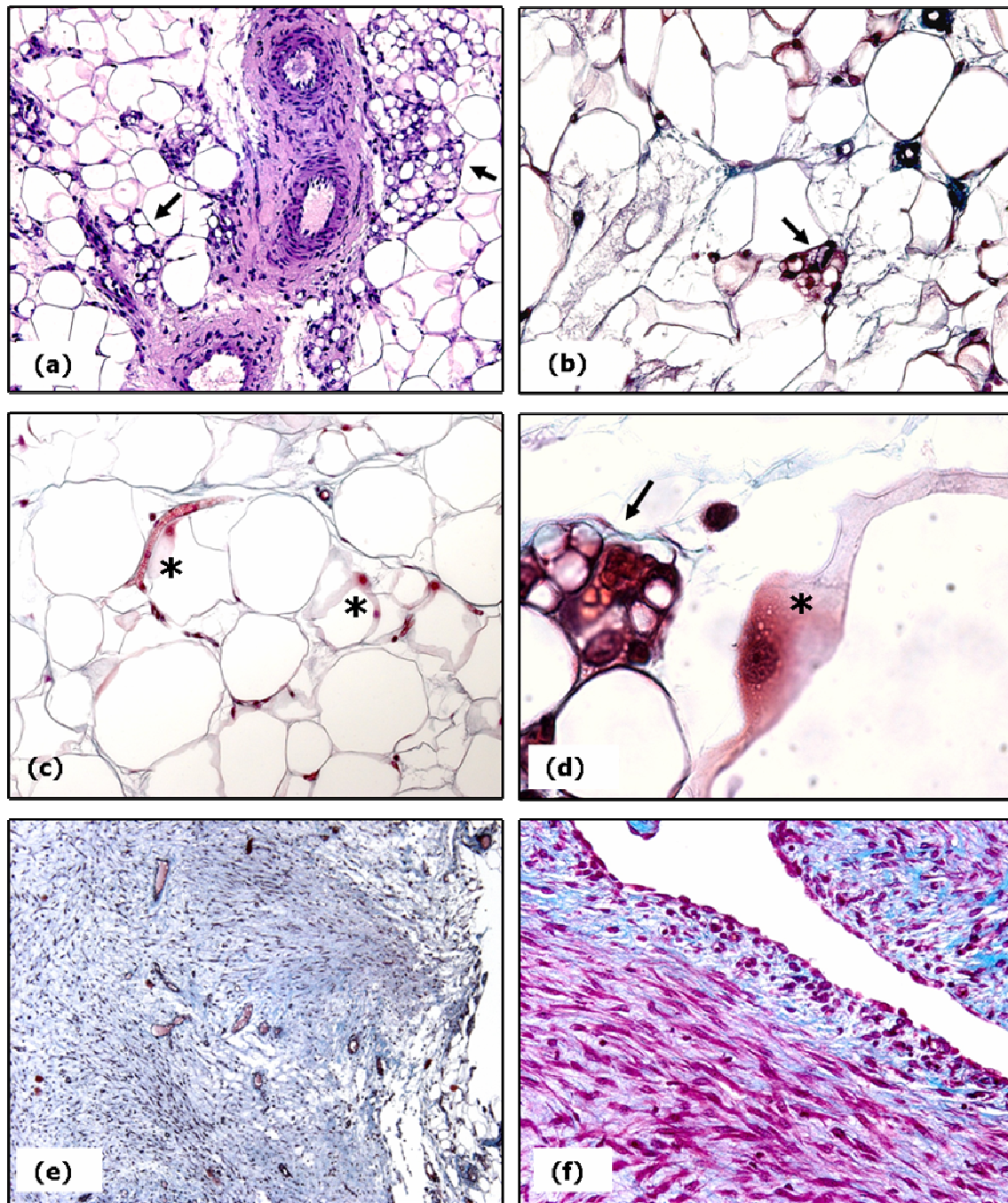


Figura 17: Adherencias de 14 días. En las adherencias con componente adiposo (a, b, c y d) se observaron zonas de regeneración, en ocasiones cercanas a los vasos, con preadipocitos y adipocitos de menor tamaño (→). Se distinguían células con características de célula mesenquimal (*) cercanas a estas áreas de regeneración tisular (d) o en la localización perivascular típica de los pericitos (c); En las adherencias con componente fibroso se observó gran cantidad de colágeno y la presencia de miofibroblastos (e) y (f). Tinción de hematoxilina-eosina (a, 160x) y tricrómico de Masson (b, 320x; c, 200x; d, 1000x; e, 80x y f, 320x)

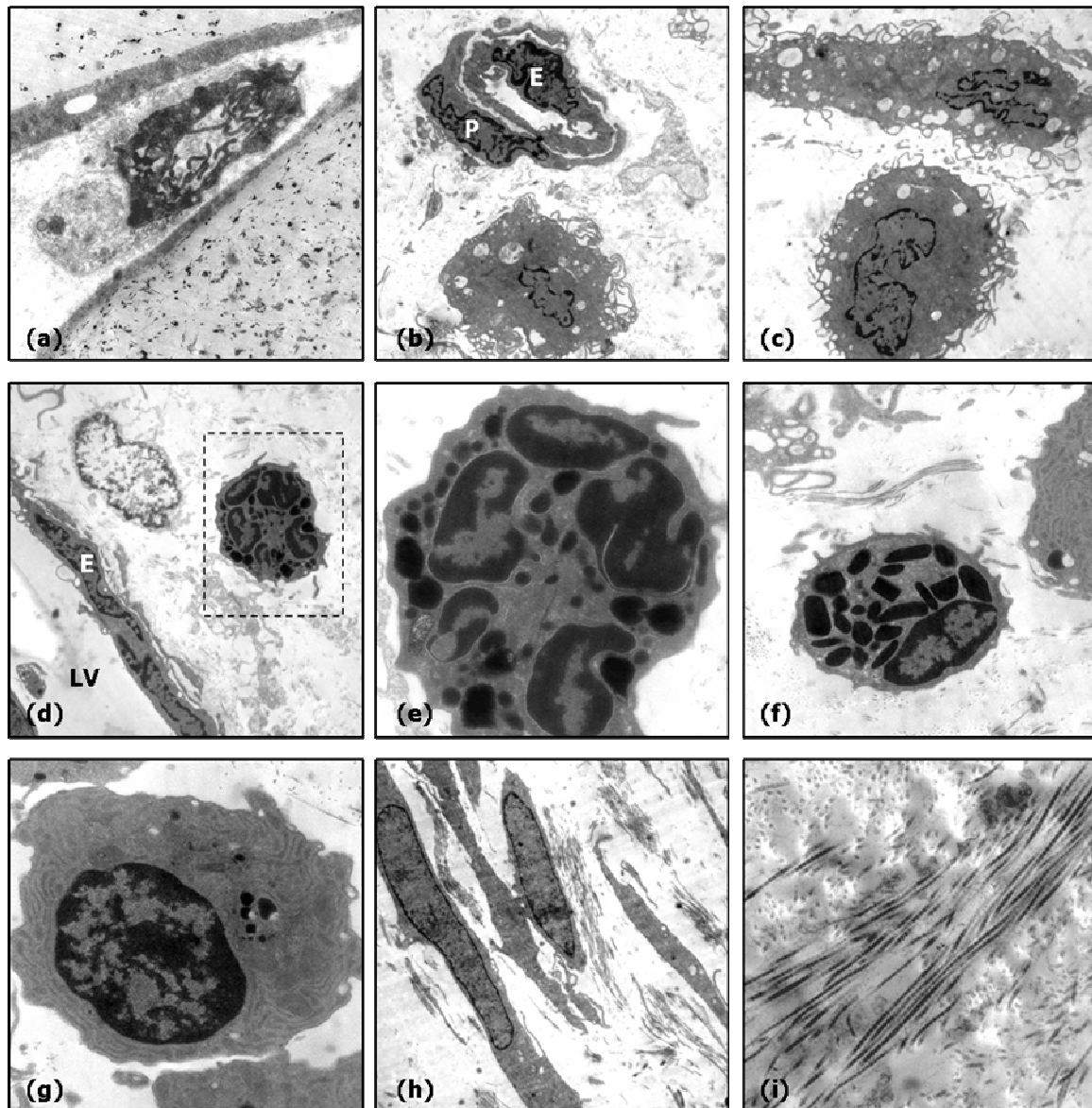


Figura 18: Ultraestructura de las adherencias de 14 días. (a) Mitosis en la zona intermedia entre dos adipocitos, que muestra la elevada proliferación celular de este tejido (6300x); Se observaron un gran número de células mesenquimales muy secretoras (b) y (c) (2500x) diferenciándose algunas de ellas a preadipocitos (c), que se disponían a menudo en las cercanías de los capilares (b); (d) Neutrófilo en la cercanía de un vaso. Se observa una célula contigua con el núcleo apoptótico (3150x); (e) Zona recuadrada en la imagen anterior a mayor aumento (8000x); (f) Basófilo junto a una célula plasmática (5000x); (g) Célula plasmática con retículo endoplasmático dispuesto de forma paralela y lisosomas en su citoplasma (6300x); (h) En las zonas más fibrosas se observaron células fibroblastoides que secretaban grandes cantidades de colágeno (2500x); i) Se observaron gran cantidad de fibras de colágeno con diferentes orientaciones (12500x). (P, pericito; LV, luz del vaso; E, células endoteliales).

3.1.2.3 ESTUDIOS HISTOLÓGICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS

3.1.2.3.1 Células de la respuesta inflamatoria

Tejido omental

En el omentum control se observaron isletas de agregados de células mononucleares redondas, correspondientes a células inmunes presentes en los GO. Sin embargo, no se observó la presencia de linfocitos, mastocitos o monocitos macrófagos activados.

En el omentum activado, pudimos observar que tras el implante de un biomaterial se desencadenaba una intensa reacción que activaba a los macrófagos, pudiendo observarse células positivas en el entorno de la cubierta mesotelial. La presencia de linfocitos activados continuaba siendo inexistente.

Tejido adherencial

Macrófagos

El estudio inmunohistoquímico con el anticuerpo monoclonal RAM-11 ponía de manifiesto la presencia de macrófagos activos en el tejido adherencial de todos los tiempos de estudio.

Es a los 3 días post-cirugía cuando encontrábamos la mayor cantidad de macrófagos activados en el tejido adherencial (**figura 19**). Éstos se disponían mayoritariamente en forma de células gigantes de cuerpo extraño o en el entorno de los GO presentes en el mesotelio engrosado reactivo que se desarrollaba en este momento, caracterizado por una elevada proliferación celular (**figura 20**). Los GO, que aparecían a modo de corona, estaban formados por células monocíticas activadas, compatibles con la secreción y acúmulo de citocinas proinflamatorias. Esta activación monocitaria también se transmitía, en menor medida, a las células presentes en el tejido adiposo a lo largo del territorio periadventicial. A partir de los 3 días, el tejido adherencial mostraba una disminución gradual en el porcentaje de macrófagos activados, que era significativa a los 14 días post-cirugía (**figura 19**).

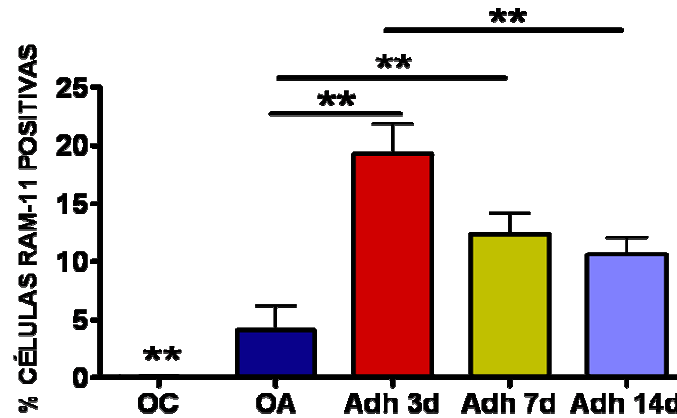


Figura 19: Porcentaje de macrófagos activados con respecto al número total de células presentes en el tejido. ** $p < 0.01$. OC, omentum control; OA, omentum activado; Adh, adherencias.

En las adherencias de 7 días, la mayoría de las células positivas se seguían encontrando en el entorno de los GO, aunque a este tiempo, las células tendían hacia el interior del tejido, mostrando la mayor reactividad en el ámbito submesotelial (**figura 20**).

A los 14 días, la presencia de células macrofágicas activadas predominaba en la zona periférica, donde el mesotelio reactivo continuaba presentando una importante actividad. En las zonas de tejido diferenciado, la presencia macrofágica disminuía de manera notoria. La restricción de las células positivas a los GO del tejido adiposo diferenciado se observó en las zonas que mostraban la permanencia de este tipo de tejido conectivo, mientras que el desarrollo de un tejido conjuntivo denso coincidía con la presencia de células positivas aisladas, distribuidas de manera dispersa y marcadas individualmente (**figura 20**).

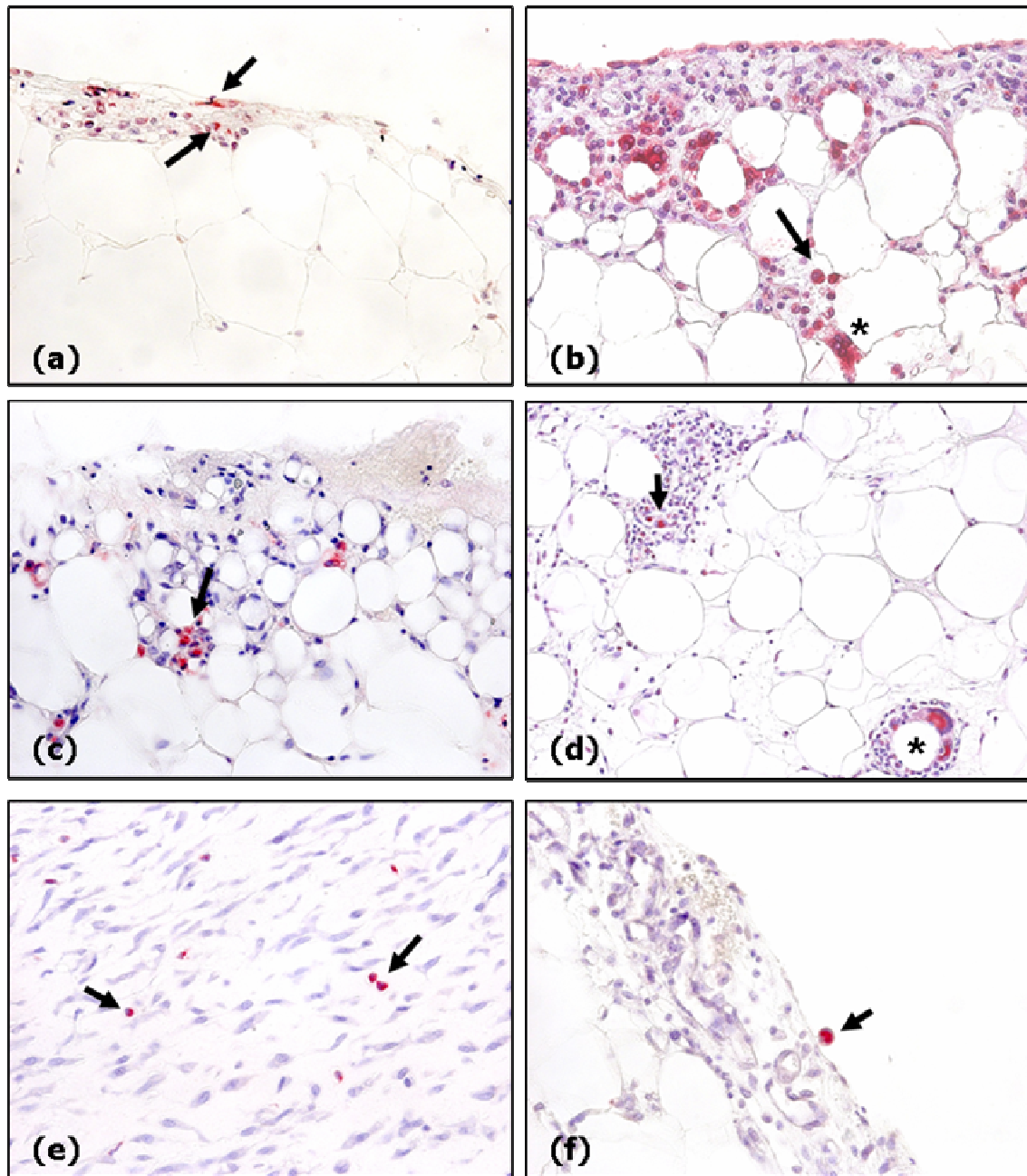


Figura 20: Expresión de RAM-11 en las células macrofágicas (→) y células gigantes de cuerpo extraño (*). (a) En el omentum activado se observa la presencia de macrófagos en las zonas más externas, expuestas al fluido peritoneal (400x); (b) Elevada presencia macrofágica en las adherencias de 3 días (320x); (c) Macrófagos en una zona de regeneración tisular en una adherencia de 7 días (400x); (d) Adherencia de 14 días con predominancia de componente adiposo (200x); (e) Adherencia de 14 días con predominancia de componente fibroso (400x); (f) Macrófago peritoneal en la superficie de una adherencia de 3 días (400x)

Población linfocitaria

La población linfocitaria, ya presente en las adherencias de 3 días, mostraba su mayor respuesta a los 7 días, disminuyendo bruscamente a tiempos más largos. En el tejido adherencial de todos los tiempos, se observaba una gran cantidad de células con características típicas de linfocito (células mononucleadas de pequeño tamaño y escaso citoplasma, cuyo núcleo suponía prácticamente la totalidad de la célula) que, sin embargo, no resultaban positivas para ninguno de los 3 anticuerpos ensayados (células T CD4+, células T CD8+ o células B).

Los linfocitos T CD4+ activados en las adherencias de 3 días se situaban en la vertiente apical del mesotelio, en ocasiones, en áreas denudadas y en zonas activadas del mesotelio engrosado (**figura 21**). Se encontraban en el interior del parénquima de las áreas activadas y en el interior de los vasos linfáticos o vénulas. Esta subpoblación aparecía mayoritariamente a los 7 días post-cirugía, disminuyendo su porcentaje de manera significativa ($p<0.05$) a los 14 días (**figura 22**).

Los linfocitos T CD8+ activados mostraban su pico de expresión de manera más temprana, a los 3 días post-cirugía. Se distribuían mayoritariamente en forma de agregados, tapizando parte de la superficie adherencial; o como células llegadas al tejido mediante su canalización a través del torrente sanguíneo; en el interior del espacio submesotelial activado y en el entorno de los GO (**figura 21**). El porcentaje de linfocitos T CD8+ disminuía a tiempos más largos, siendo la diferencia significativa ($p<0.05$) a 14 días (**figura 22**).

Los linfocitos B mostraban un comportamiento similar a los linfocitos T CD4+, con escasa presencia a los 3 días y un aumento significativo a los 7 días. A los 14 días post-cirugía, no se observaron linfocitos B activados en el tejido adherencial (**figura 22**).

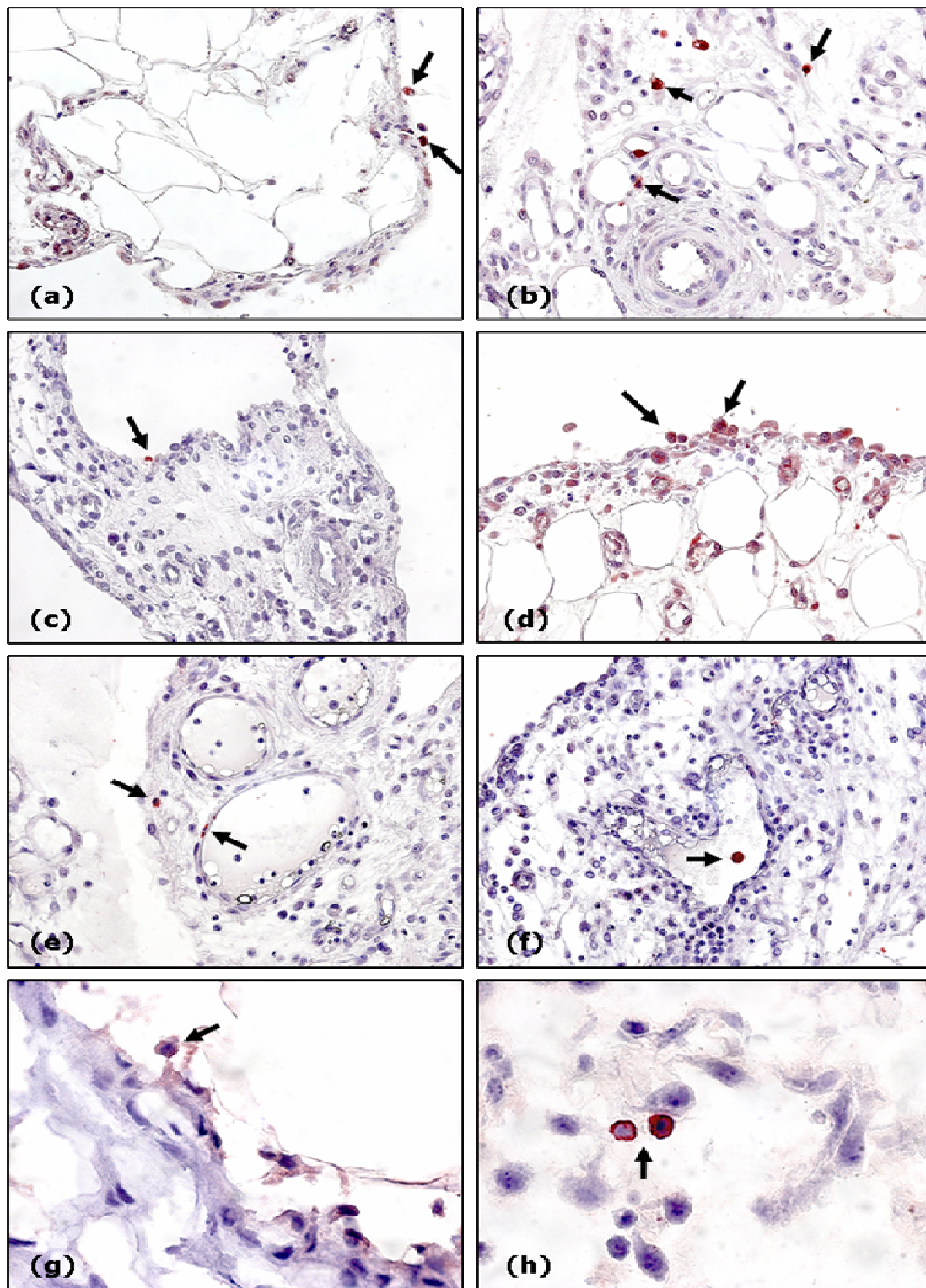


Figura 21: Detección inmunohistoquímica de subpoblaciones linfocitarias. Linfocitos T CD4+ en adherencias de 3 días (a, 400x), de 7 días (b, 400x) y de 14 días (c, 400x); Linfocitos T CD8+ en adherencias de 3 días (d, 400x), de 7 días (e, 400x) y de 14 días (f, 400x). En la imagen (e) se observa el proceso de diapédesis de un linfocito T CD8+ a través del endotelio de una vénula y otro en el exterior; Linfocitos B en adherencias de 3 días (g, 400x) y de 7 días (h, 1000x).

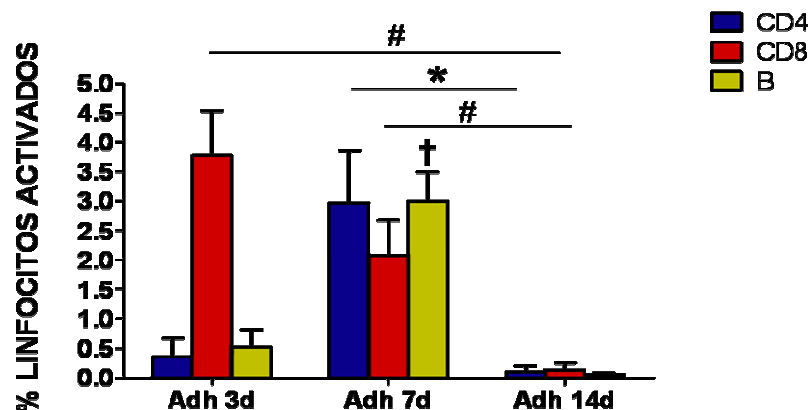


Figura 22: Porcentaje de células positivas mediante inmunohistoquímica para cada una de las poblaciones linfocitarias, con respecto al número total de células presentes en el tejido. El omentum control y el omentum activado no presentaban linfocitos activados.

* diferencias estadísticamente significativas en cuanto al porcentaje de células CD4+ ($p < 0.05$).

diferencias estadísticamente significativas en cuanto al porcentaje de células CD8+ ($p < 0.05$).

†, diferencias estadísticamente significativas en cuanto al porcentaje de células B+ ($p < 0.05$).

Mastocitos

El anticuerpo empleado nos permitió identificar la triptasa mastocítica, mediador químico en la inflamación y presente en mastocitos en estado activado. Permitió observar, además, la presencia de basófilos, ya que estos contienen pequeñas cantidades de triptasa.

La presencia de mastocitos activos se observó, generalmente, en las cercanías de los vasos y de forma mayoritaria en el tejido adherencial de 3 días de madurez.

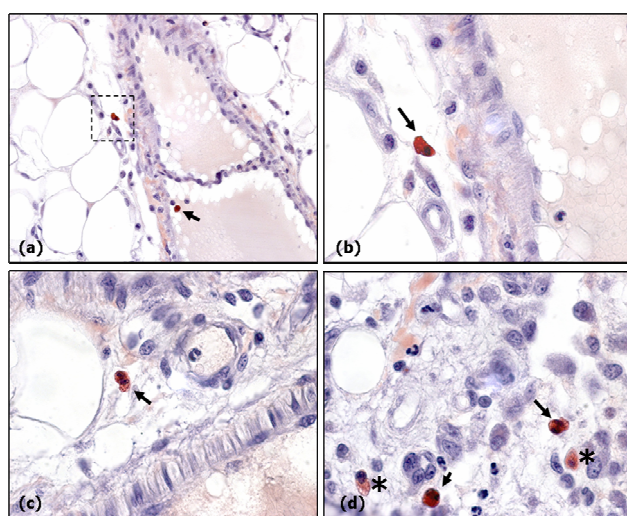


Figura 23: Expresión de triptasa en los mastocitos (\rightarrow) de adherencias de 3 días. (a) Los mastocitos aparecían generalmente cerca de los vasos (400x); (b) Detalle de la zona recuadrada en (a). Se observa un mastocito en la adventicia de una vena (100x); (c) Mastocito en el que se aprecian los gránulos de triptasa (100x); (d) Región con células inflamatorias. Se observan mastocitos (\rightarrow), neutrófilos y células con un marcaje más débil que los mastocitos (*), correspondientes, probablemente, a basófilos (100x).

3.1.2.3.2 Factor de crecimiento transformante β

LAP-TGF β 1

En el omentum nativo, la expresión de la forma latente del TGF- β 1 se hallaba situada a nivel basal del mesotelio, sobre las láminas del componente elástico de la matriz submesotelial y, a nivel de tejido adiposo, en las zonas perinucleares de los adipocitos (**figura 24**).

Este componente disminuía claramente cuando el omentum era activado. Así, en las adherencias de 3 días, el depósito de LAP-TGF β 1 a nivel de la matriz apenas era visualizado como un discreto depósito generalizado, asociado al componente elástico fibrilar (microfibrillas), más que al laminar observado en el omentum no dañado. Se apreciaba un marcaje más intenso a nivel de las células mesoteliales y matriz submesotelial. Se observaron células grandes redondeadas compatibles con células inflamatorias o células proliferantes positivas para LAP-TGF β 1 (**figura 24**).

A los 7 días, la actividad del LAP-TGF β 1 tan sólo era detectada en pequeñas áreas muy localizadas. Se mantenía el marcaje sobre células de aspecto proliferativo o inflamatorio que se situaban en zonas en remodelación altamente celulares, en las que se observaba una incipiente red microvascular (**figura 24**).

A 14 días, la estructura histológica del tejido adherencial mostraba actividad en el citoplasma de los miofibroblastos y en la matriz extracelular de las zonas fibrosas que los soportaban, así como en células gigantes de cuerpo extraño (**figura 24**).

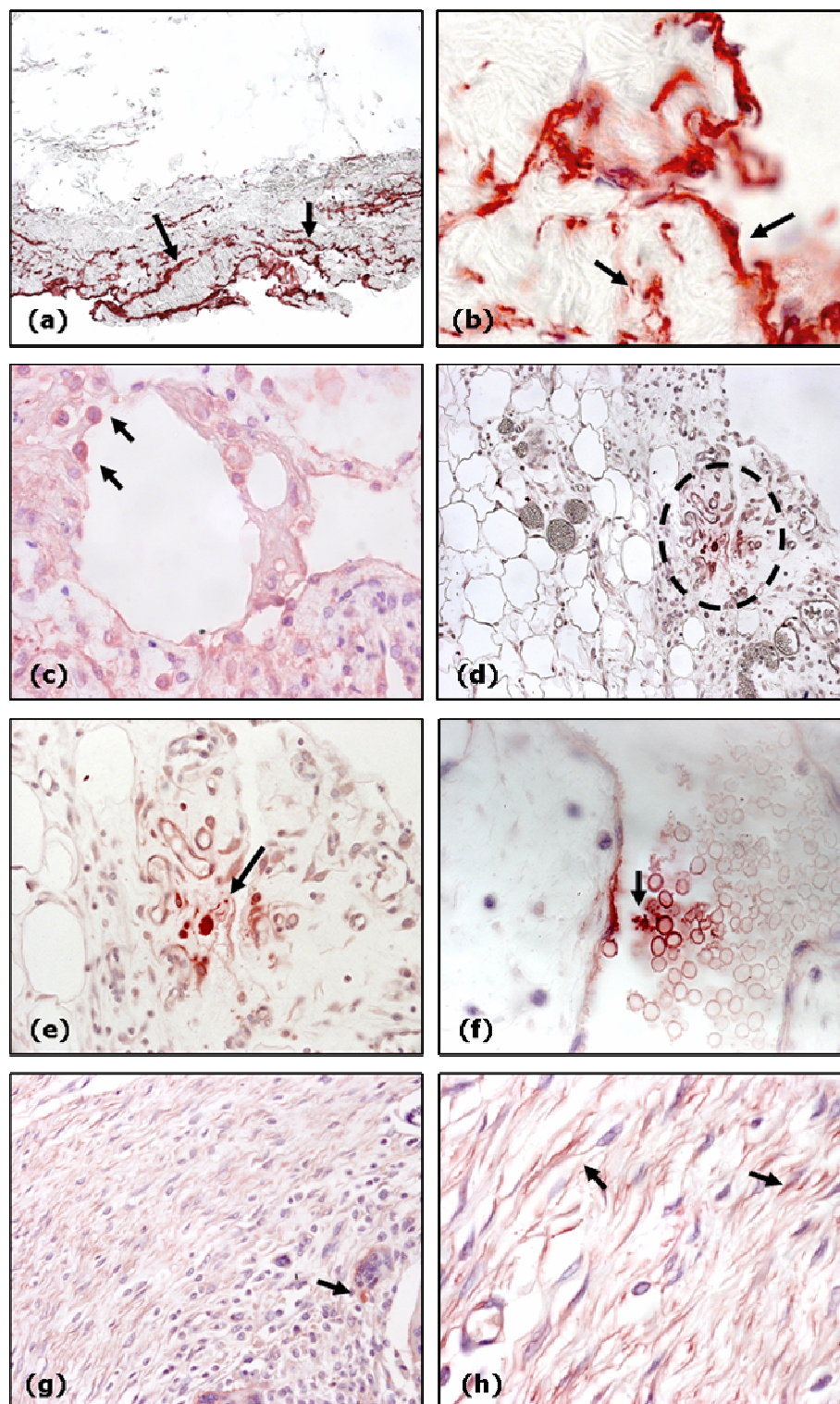


Figura 24: Expresión de LAP-TGF β . En el omentum nativo, el marcaje (\rightarrow) aparecía a nivel basal de mesotelio y en el submesotelio (a, 200x; b, 1600x); (c) En las adherencias de 3 días se observaba marcaje en células inflamatorias (\rightarrow), y de manera homogénea en la matriz (630x); (d) Mínima presencia de LAP-TGF β 1 en adherencias de 7 días (----) (200x); (e) Detalle de la zona observada en (d), con células proliferantes y/o inflamatorias positivas para este marcador (400x); (f) Plaquetas positivas para el LAP-TGF β 1 en una adherencia de 7 días (400x); (g) Marcaje en el contorno de una célula gigante de cuerpo extraño (\rightarrow) en una adherencia de 14 días (400x); (h) Detalle del marcaje en el citoplasma de miofibroblastos y matriz extracelular en una región de una adherencia de 14 días de componente fibroso (1000x)

TGF- β 1

La expresión de TGF- β 1 activo era prácticamente negativa en el omentum no dañado.

En el omentum activado, se apreciaba un ligero aumento en la expresión de este factor a nivel vascular, debido al aumento en el número de pequeños vasos en este tejido, especialmente en el área submesotelial.

A los 3 días, el tejido adherencial mostraba una fuerte expresión para el TGF- β 1 activo en la matriz extracelular del entorno perivascular de áreas con elevada angiogénesis (**figura 25**). Esta matriz presentaba una distribución discretamente reticular, con aspecto de procolágeno. Las células que se encontraban inmersas en esta matriz mostraban un estado de diferenciación hacia célula fibroblástica o miofibroblástica, con aspecto fusiforme, siendo muy clara la distinción entre las zonas activadas y aquellas en estado de reposo. Se observaba una expresión considerable en la proximidad del endotelio vascular y en células mesoteliales activadas, siendo negativo a nivel del mesotelio no reactivo y del tejido adiposo.

En las adherencias de 7 días, encontramos expresión de TGF- β 1 a nivel de la matriz extracelular, especialmente perivascular, de aquellas zonas que presentaban una intensa actividad inflamatoria (**figura 25**).

A los 14 días post-cirugía el TGF- β 1 era observado en el endotelio del componente venoso en áreas vasculares reactivas, en algunas células de cuerpo extraño y en pequeñas áreas localizadas del componente fibroso, éstas últimas coincidentes con microvasos y restos de extravasación plasmática (**figura 25**).

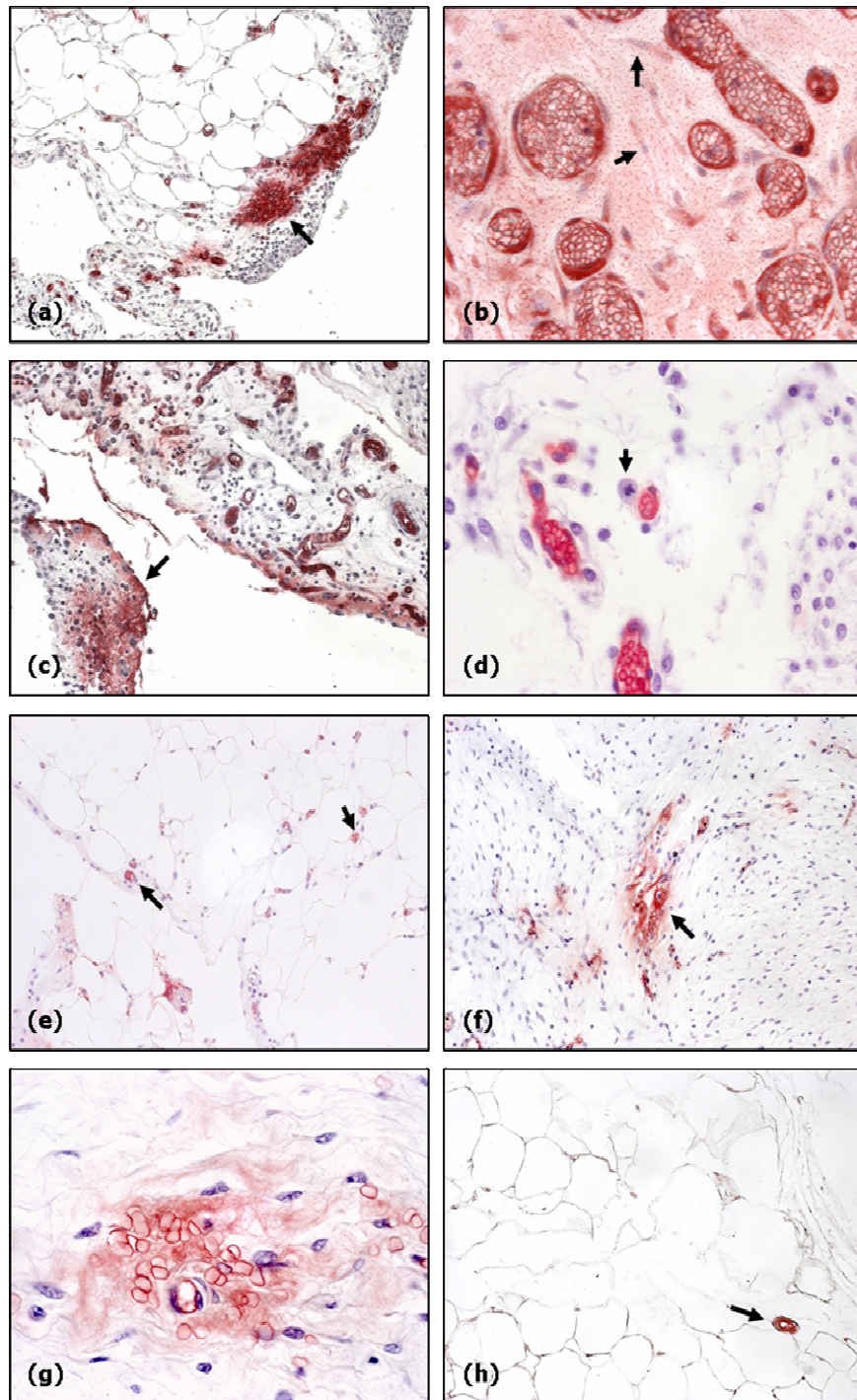


Figura 25: Expresión de TGF- β activo. (a) Adherencias de 3 días. Se observaba expresión para el TGF- β a nivel de la microvasculatura y en áreas activas (→) (200x); (b) Células con aspecto fusiforme en la matriz de una región neoangiogénica de una adherencia de 3 días (640x); (c) Las adherencias de 7 días mostraban marcaje en áreas con presencia de células inflamatorias (→), además de a nivel del árbol vascular (200x); (d) Célula en división (→), adyacente a un microvaso (630x); (e) En adherencias de 14 días con componente predominantemente adiposo, el marcaje quedaba prácticamente restringido a nivel vascular (200x); (f) En adherencias de 14 días con componente fibroso, se encontraba positividad en áreas localizadas, en las que se observaban microvasos (200x); (g) Detalle de una zona fibrosa con presencia de TGF- β activo. Se observa un microvaso cuyo endotelio es positivo y la presencia de hematíes extravasados (1000x); (h) Mínima presencia de TGF- β activo, que se reduce al árbol vascular, en el omentum nativo (200x).

TGF- β 3

Se encontraba una discreta presencia de este factor en el plasma contenido en algunos vasos, especialmente del omentum. El TGF- β 3 aparecía en células marcadas individualmente con aspecto de célula inflamatoria, cuya presencia era prácticamente nula en el omentum. En el tejido adherencial, se localizaban formando parte de los GO, en las zonas perivasculares activadas y en algunas áreas del mesotelio, ya fuera formando parte de él o adheridos en forma de agregados de células procedentes de la cavidad peritoneal. En general, las zonas de tejido conectivo denso con presencia miofibroblástica que aparecían a 7 y 14 días post-cirugía no mostraban expresión alguna para este factor (figura 26).

Betaglicano

El betaglicano, o receptor tipo III del TGF- β , aparecía en su forma soluble a nivel del árbol vascular del omentum nativo (figura 27), siendo negativo en el tejido linfático y adiposo que rodeaban dicho eje vasculo-linfático. La presencia de este receptor podía ser observada en áreas proliferativas inmersas en el tejido adiposo, donde se apreciaba una discreta positividad a nivel de las membranas celulares. En las GO, el receptor colocalizaba con la presencia de TGF- β 3, y se expresaba en células perivasculares.

En las adherencias de 3 días, se observaba una intensa expresión de este factor en células aisladas presentes en el mesotelio engrosado (células mesoteliales o inflamatorias) y de su forma soluble en el plasma sanguíneo (figura 27). Se encontraba una intensa expresión de la forma anclada a membrana en el citoplasma de los adipositos y en las células procedentes de las GO, que empezaban a colonizar el tejido adiposo.

A los 7 días, se producía una disminución de la forma soluble del betaglicano, a medida que aumentaba la forma anclada a membrana celular. Disminuía la actividad para el betaglicano en la cercanía de los GO y se observó la expresión de su forma anclada a membrana en células de aspecto inflamatorio localizadas en áreas muy celulares y/o angiogénicas, a menudo dispuestas en la cercanía de los vasos sanguíneos preexistentes (figura 27). Era visible en alguna célula blanca (fuera de los linfáticos, en su mayoría), y se observó positividad en algunas células de la media profunda de los vasos en el límite con

la adventicia, que podrían corresponder a pericitos, así como en células de aspecto miofibroblástico situadas en zonas de naturaleza fibrosa.

A los 14 días post-cirugía, aparecía de nuevo la forma soluble, presente en la matriz formada tras la extravasación sanguínea, y en el interior de los vasos. Se encontraba actividad a nivel de los adipocitos y en las células de la cubierta mesotelial del tejido adherencial. Se volvía a encontrar una notable expresión de betaglicano en los GO, además de en el interior de los vasos linfáticos (**figura 27**), lo que sugería una internalización de las células blancas del tejido hacia los vasos linfáticos entre los 7 y los 14 días.

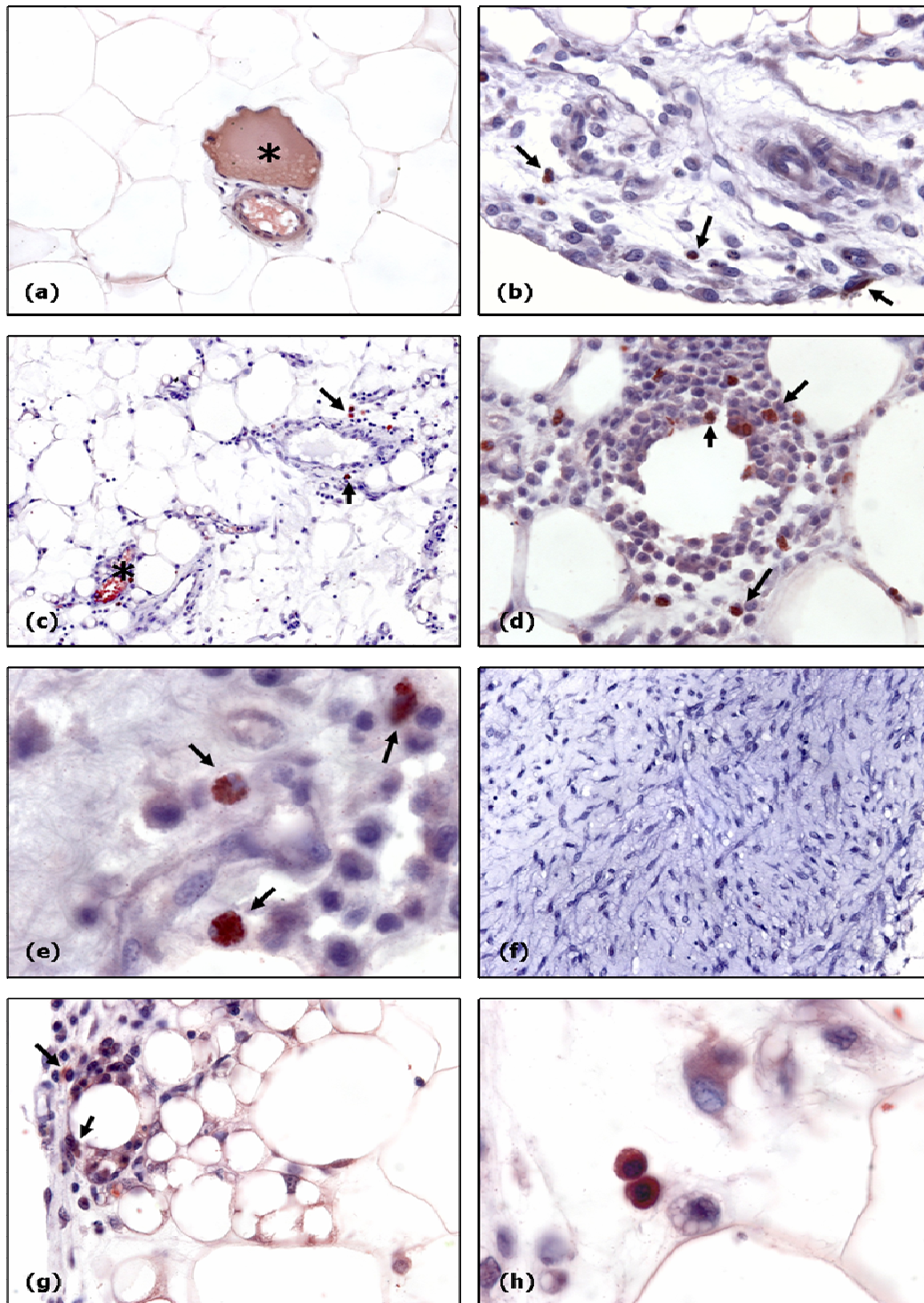


Figura 26: Expresión de TGF- β 3 en células aisladas (→) y en el plasma sanguíneo (*). (a) Omentum nativo (400x); (b) Adherencias de 3 días con marcaje en mesotelio y submesotelio (640x); (c) Adherencias de 7 días con células positivas con localización perivascular (200x); (d) Elevada presencia de células positivas en un glomérulo omental de una adherencia de 7 días (640x); (e) Detalle del marcaje intracitoplasmático (1600x); (f) Ausencia de expresión en una adherencia de 14 días de componente fibroso (320x); (g) Adherencia de 14 días de componente adiposo que muestra positividad en células que forman parte de un glomérulo omental situado bajo el mesotelio. Obsérvese la regeneración de tejido adiposo que se produce en el tejido subyacente a él (640x); (h) Células con aspecto inflamatorio, positivas para TGF- β 3, junto a una preadipocito en diferenciación en una adherencia de 14 días (1600x).

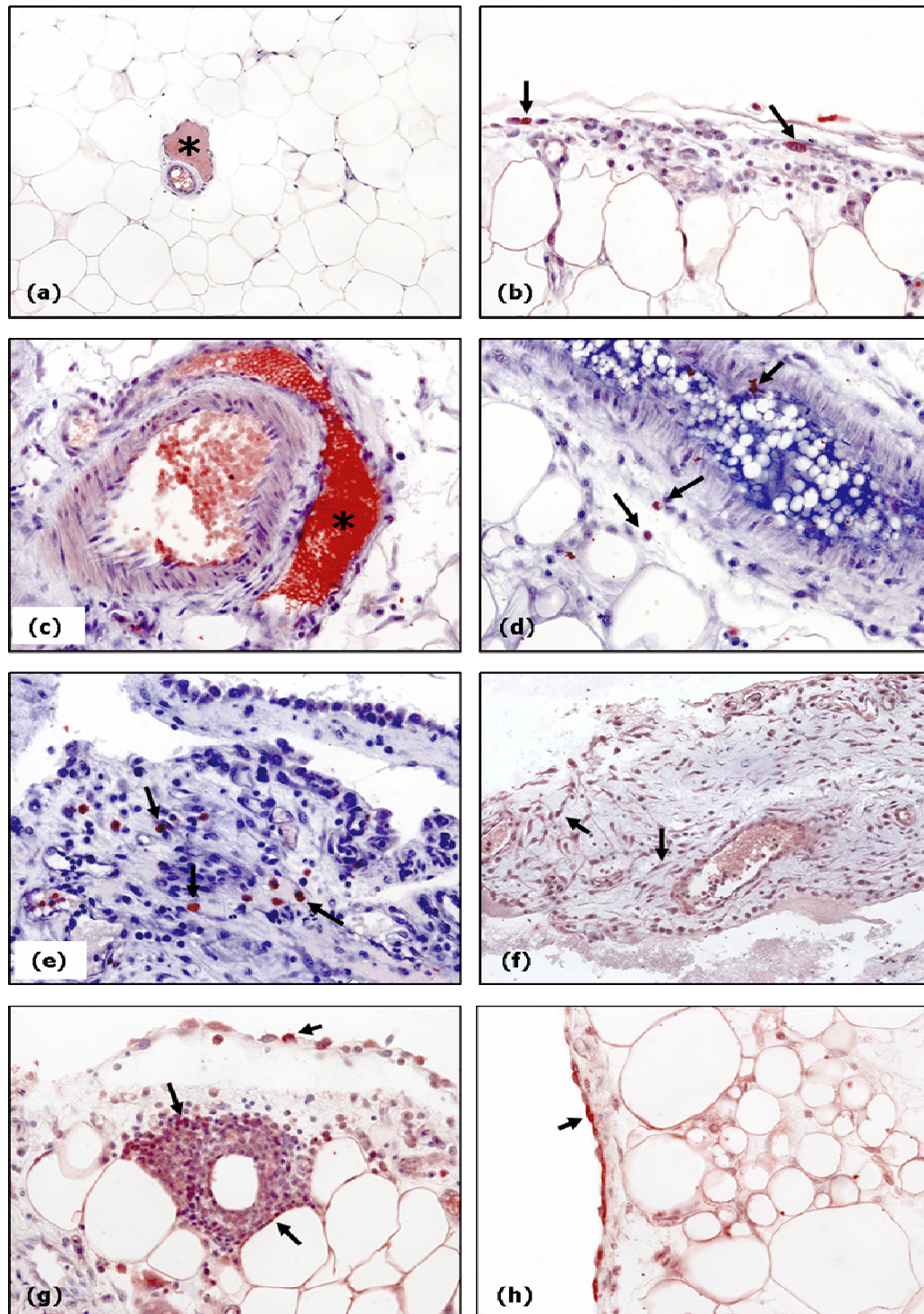


Figura 27: Marcaje inmunohistoquímico para las formas soluble (*) y anclada a membrana (→) del betaglicano. (a) Discreta presencia de la forma soluble en el omentum nativo (200x); En las adherencias de 3 días encontramos marcaje en células localizadas en el mesotelio (b, 400x) y en el plasma (c, 400x); En las adherencias de 7 días se observó la expresión de este factor en células inflamatorias (d, 400x y e, 400x) y en células de fenotipo fibroblástico/miofibroblástico (f, 200x); En las adherencias de 14 días se encontraba marcaje a nivel de las células contenidas en los GO (g, 400x), en células mesoteliales (g y h) y a nivel del tejido adiposo (h, 400x).

3.1.2.3.3 Factor de crecimiento de endotelio vascular

La expresión de VEGF se encontraba a nivel endotelial del árbol vascular arterial y venoso, siendo negativo para el linfático. Se observaba marcaje en la membrana de los hematíes, probablemente debido a la forma soluble del VEGF presente en el plasma.

En el omentum, el citoplasma de los adipocitos, así como la MEC del mesotelio, también eran positivos para este marcador (**figura 28**). En el tejido adherencial, el VEGF aparecía expresado en células asociadas al componente adventicial vascular, compatibles con mastocitos. La presencia de este tipo celular positivo para este factor de crecimiento se mantenía en el tejido adherencial desde los 3 a los 14 días post-cirugía.

A los 7 días era muy evidente la neoangiogénesis, describiendo este marcador la microvasculatura tisular. Estas zonas coincidían con la presencia de células de aspecto inflamatorio. Se encontraba expresión para el VEGF en algunos linfocitos situados en los vasos linfáticos y en la región perinuclear de algunos adipocitos. La presencia de la forma soluble del VEGF en el exterior de los vasos fue observada en zonas de remodelación tisular (**figura 28**).

Tras dos semanas de evolución, se encontró una disminución en la expresión de este marcador, manteniéndose presente en todo el endotelio vascular (**figura 28**). Las adherencias de 14 días con predominancia de componente adiposo mostraban una morfología y vascularización similar al omentum nativo, mientras que aquellas regiones fibróticas con diferenciación miofibroblástica apenas se encontraban vascularizadas por microvasos y se observaba, en ocasiones, el depósito de VEGF acumulado en la MEC.

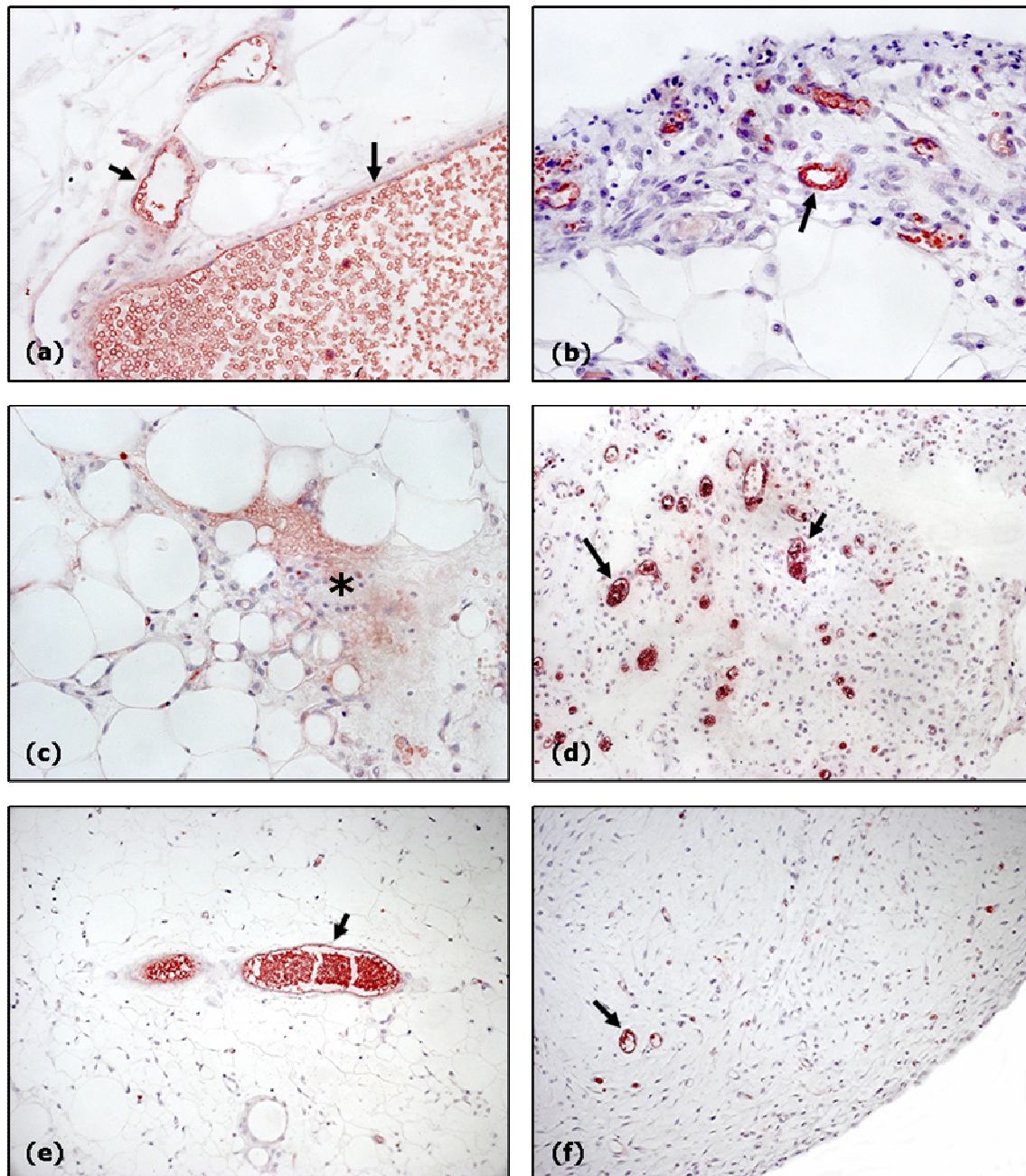


Figura 28: Expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF). Aparecía en el endotelio vascular (→) del omentum nativo (a, 400x), en adherencias de 3 días (b, 400x), en adherencias de 7 días (d, 200x) y en adherencias de 14 días (e, 200x; y f, 200x);. (c) Su forma soluble (*) se encontraba en zonas de regeneración tisular en adherencias de 7 días (400x).

3.1.2.3.4 Componente colágeno

Colágeno III

En el omentum, el colágeno tipo III dibujaba discretamente el contorno de los adipocitos y enmarcaba los territorios vasculares. Se observaba la presencia de fibras de este tipo de colágeno en el tejido conectivo submesotelial y en las prolongaciones de éste que formaban parte de la membrana translúcida. En el tejido adherencial de 3 días, el colágeno tipo III del submesotelio se encontraba más organizado, en forma de haces. Esta técnica nos permitió observar una disminución en la cantidad de colágeno tipo III en esta zona, con respecto al omentum nativo (**figura 29**), así como un incremento de la celularidad. La expresión era muy intensa en la matriz extracelular del tejido altamente reactivo que conformaba la membrana translúcida. El colágeno III también era observado en los septos conjuntivos que separaban el tejido adiposo y en el territorio adventicial de todo el árbol vascular.

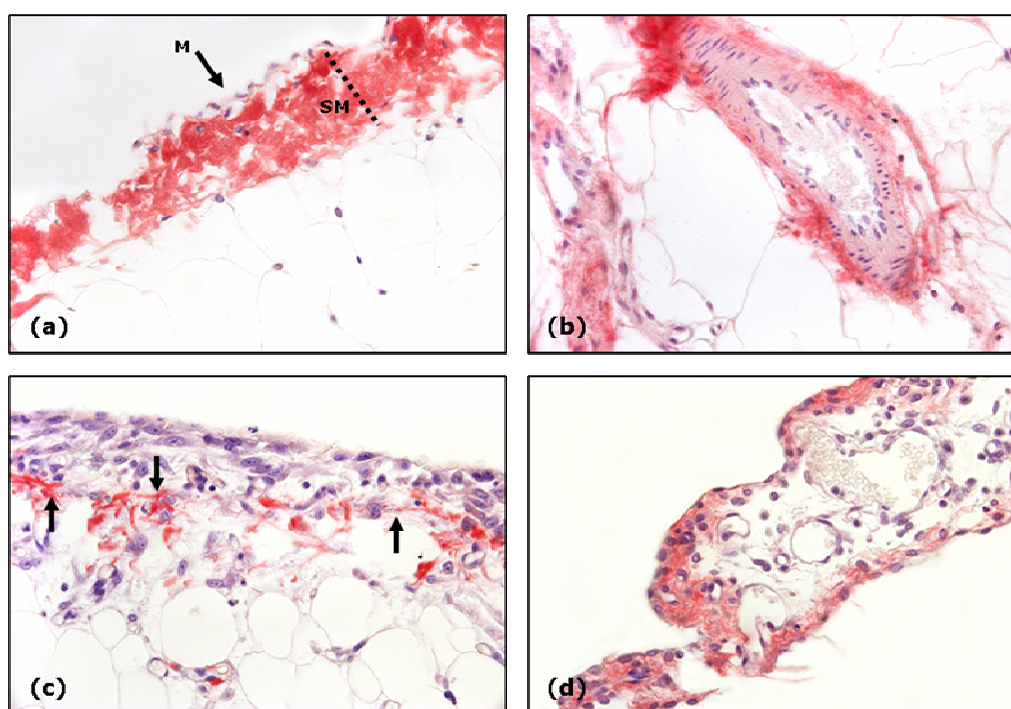


Figura 29: Marcate inmunohistoquímico para colágeno III (→) en el omentum control (a y b) y en las adherencias de 3 días (c y d) (400x). (a) Colágeno tipo III en el submesotelio (SM) del omentum. La monocapa mesotelial (M) no presentaba marcaje; (b) Presencia de colágeno III en la capa adventicia de los vasos y en las membranas de los adipocitos; (c) Haces de colágeno en el submesotelio engrosado de una adherencia de 3 días; (d) Presencia de colágeno III en la membrana translúcida.

A los 7 días, encontrábamos un aumento significativo de la cantidad de colágeno tipo III, especialmente en aquellas adherencias en las que predominaba el componente fibroso (**figura 30**). La expresión era muy elevada en las zonas de mesotelio reactivo, mientras que su localización en zonas de mesotelio ya regenerado se restringía a una lámina subyacente al mesotelio engrosado que se continuaba a través de los territorios adventiciales vasculares. El tejido fibroso que comenzaba a aparecer a este tiempo estaba integrado, en gran parte, por este colágeno. La distribución de los haces de colágeno tipo III nos permitía vislumbrar la orientación de las fuerzas biomecánicas a las que se hallaba sujeto este tejido.

A 14 días, la expresión de colágeno tipo III se veía disminuída de manera evidente, quedando reducida a la superficie perivascular, al mesotelio y a las zonas con elevada proliferación fibroblástica y de células inflamatorias, mientras que aquellas zonas integradas por células miofibroblásticas apenas mostraban positividad para el colágeno tipo III (**figura 30**).

Colágeno I

En el omentum, encontrábamos la presencia de colágeno I en la adventicia vascular y la superficie del mesotelio. Se observaba la presencia de haces de colágeno en la matriz extracelular que conforma la membrana translúcida.

En el tejido adherencial de 3 días, encontrábamos el marcaje a nivel de la lámina basal del mesotelio y en la adventicia vascular. La presencia de colágeno tipo I se incrementaba a lo largo del tiempo (7 y 14 días), apareciendo en la zona del mesotelio reactivo, en el citoplasma de células aisladas de diferentes morfologías y en la matriz extracelular, especialmente de las zonas fibrosas (**figura 31**) .

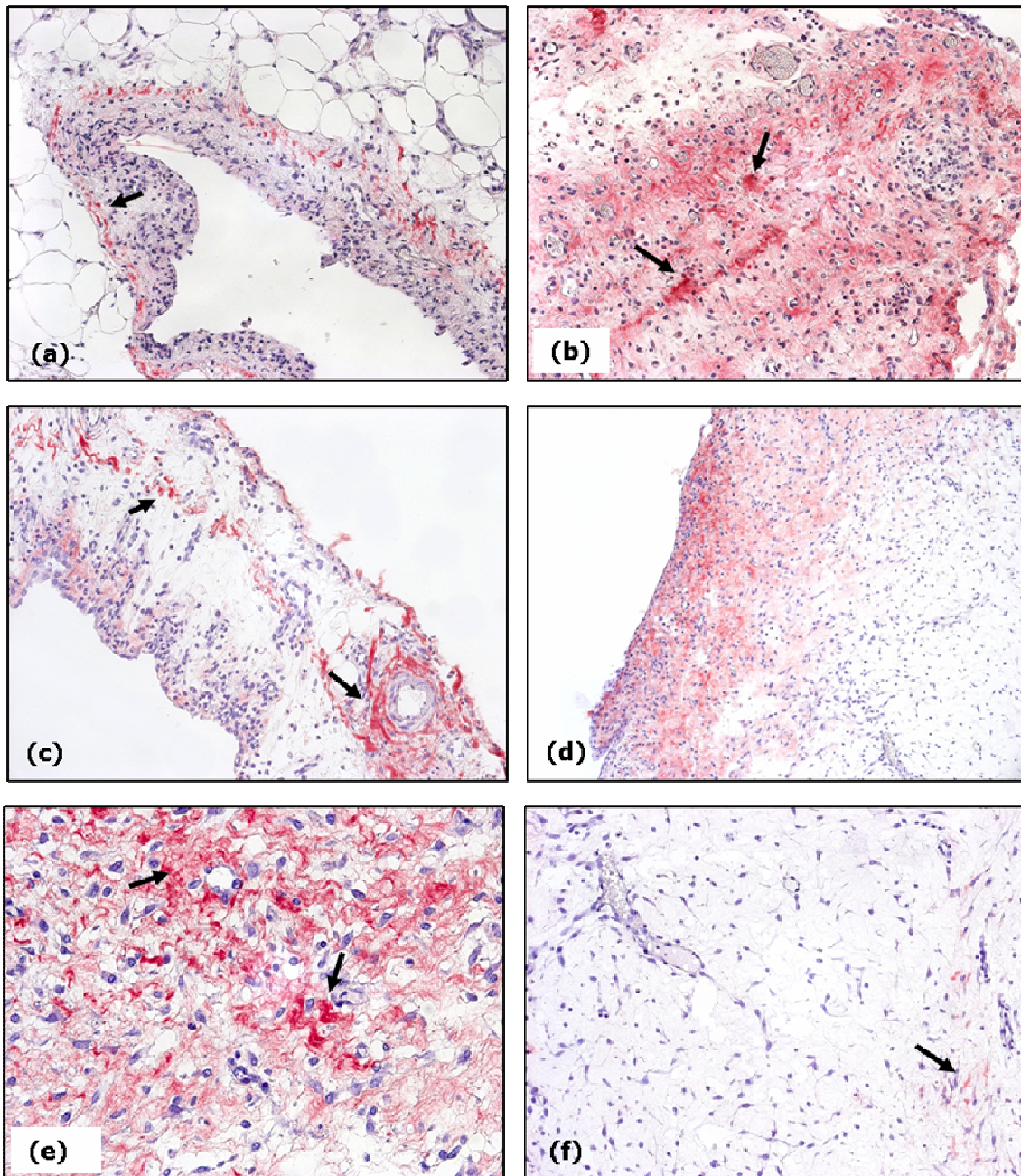


Figura 30: Expresión de colágeno tipo III (→). (a) Marcaje en el submesotelio de una adherencia de 7 días de composición adiposa (200x); (b) Intensa expresión en adherencias de 7 días de naturaleza fibrosa (200x); (c) Expresión en la membrana translúcida de una adherencia de 14 días. Este marcador pone de manifiesto la trama vascular (200x); (d) Distribución del marcaje en una adherencia de 14 días de elevada celularidad y deposición fibrosa (100x); (e) Detalle de las fibras de colágeno III en una zona con elevada proliferación celular en una adherencia de 14 días (400x); (f) Mínima expresión para este marcador en una zona de diferenciación miofibroblástica en una adherencia de 14 días (200x)

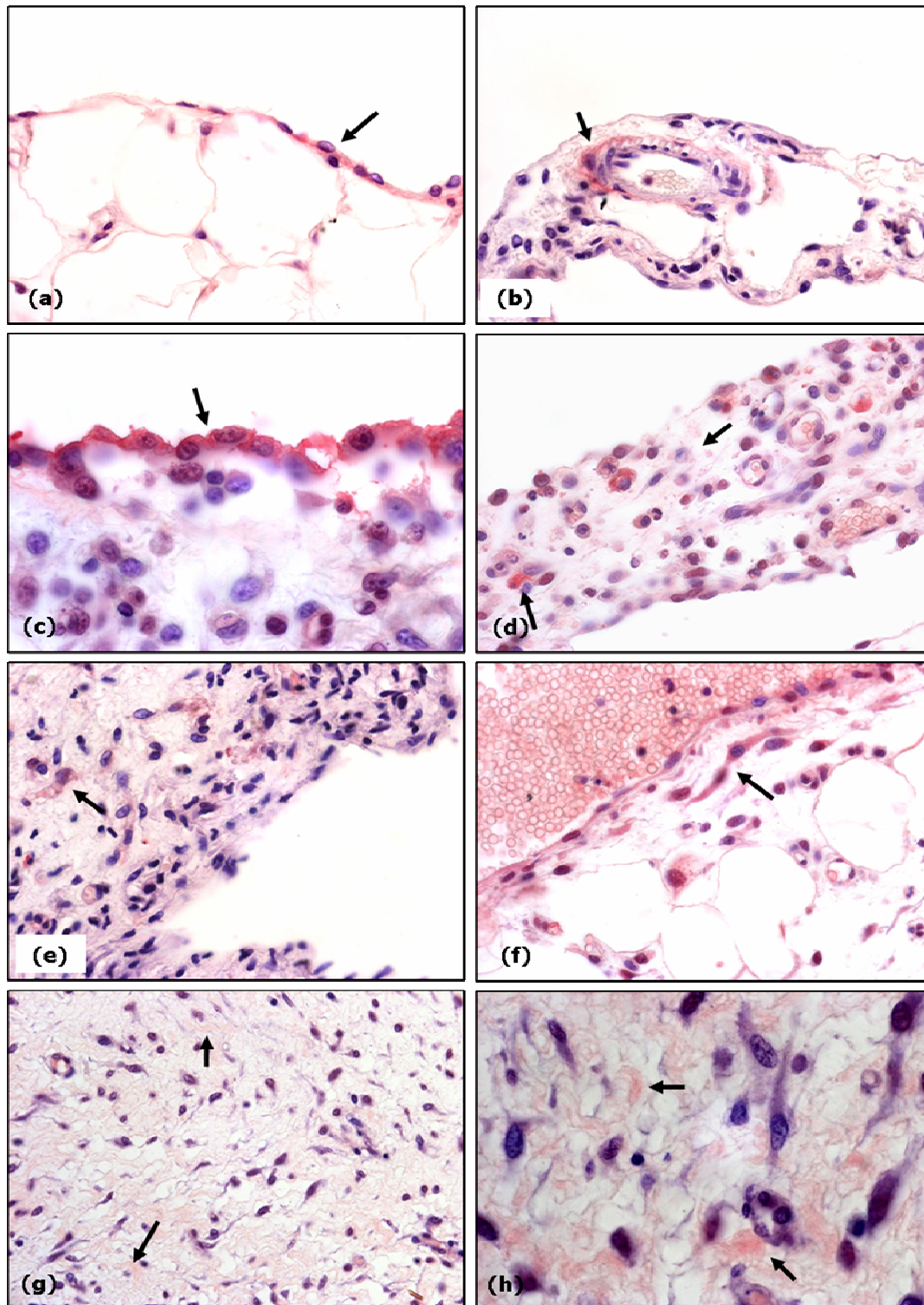


Figura 31: Marcaje inmunohistoquímico para colágeno tipo I (→). (a) Presencia a nivel del mesotelio en el omentum nativo (630x); (b) Se observaba este tipo de colágeno en el territorio de la adventicia vascular del tejido omental (630x); (c) Intensa expresión en la lámina basal del mesotelio en adherencias de 3 días (1000x); (d) Células con morfología redondeada positivas para este marcador en un corte de membrana translúcida de una adherencia de 7 días (630x); También células con morfología fibroblastoide (e, 630x) y de célula muscular lisa (f, 630x) muestran expresión para el colágeno I en adherencias de 7 días; g) El colágeno tipo I aparece de manera homogénea en la MEC de las adherencias de 14 días (g, 400x ; h, 1000x)

Tinción Rojo Sirio

Mediante la observación con luz polarizada, la tinción con rojo Sirio nos permitió realizar la valoración conjunta de los colágenos tipo I y tipo III para así apreciar el balance de ambos tipos de colágeno en la formación y desarrollo de las adherencias (**figuras 32 y 33**).

En las adherencias iniciales, el componente colágeno III predominaba en la red que formaba y soportaba todo el sustrato del tejido adherencial, especialmente en el entorno de los adipocitos. Asimismo, el componente amarillo del colágeno III destacaba en la zona periférica de la trama vascular sobre el componente rojo (colágeno I), que asomaba en la túnica media de los vasos sanguíneos.

Las zonas de tejido reactivo mostraban ambos tipos de colágeno. Podríamos decir que el colágeno I y el colágeno III aparecían en cantidades similares, aunque no colocalizaban. Esta técnica nos permitió visualizar el engrosamiento progresivo del mesotelio/submesotelio ocurrido durante el desarrollo de las adherencias.

A los 7 días, en las áreas muy fibróticas, destacaba la presencia de colágeno de tipo III., mientras que en las áreas de mesotelio reactivo predomina el colágeno tipo I, el engrosamiento de la capa submesotelial se debía a la aparición de grandes cantidades de colágeno tipo III.

A los 14 días, se apreciaba la maduración del colágeno tipo III observado a los 7 días en las zonas más fibrosas, que comenzaba a ser sustituido por colágeno tipo I, mostrando la estabilización del proceso cicatricial en el tejido. Resultaba muy visible la distribución de colágeno maduro (tipo I) en las regiones de la membrana translúcida que formaban parte de este tejido adherencial.

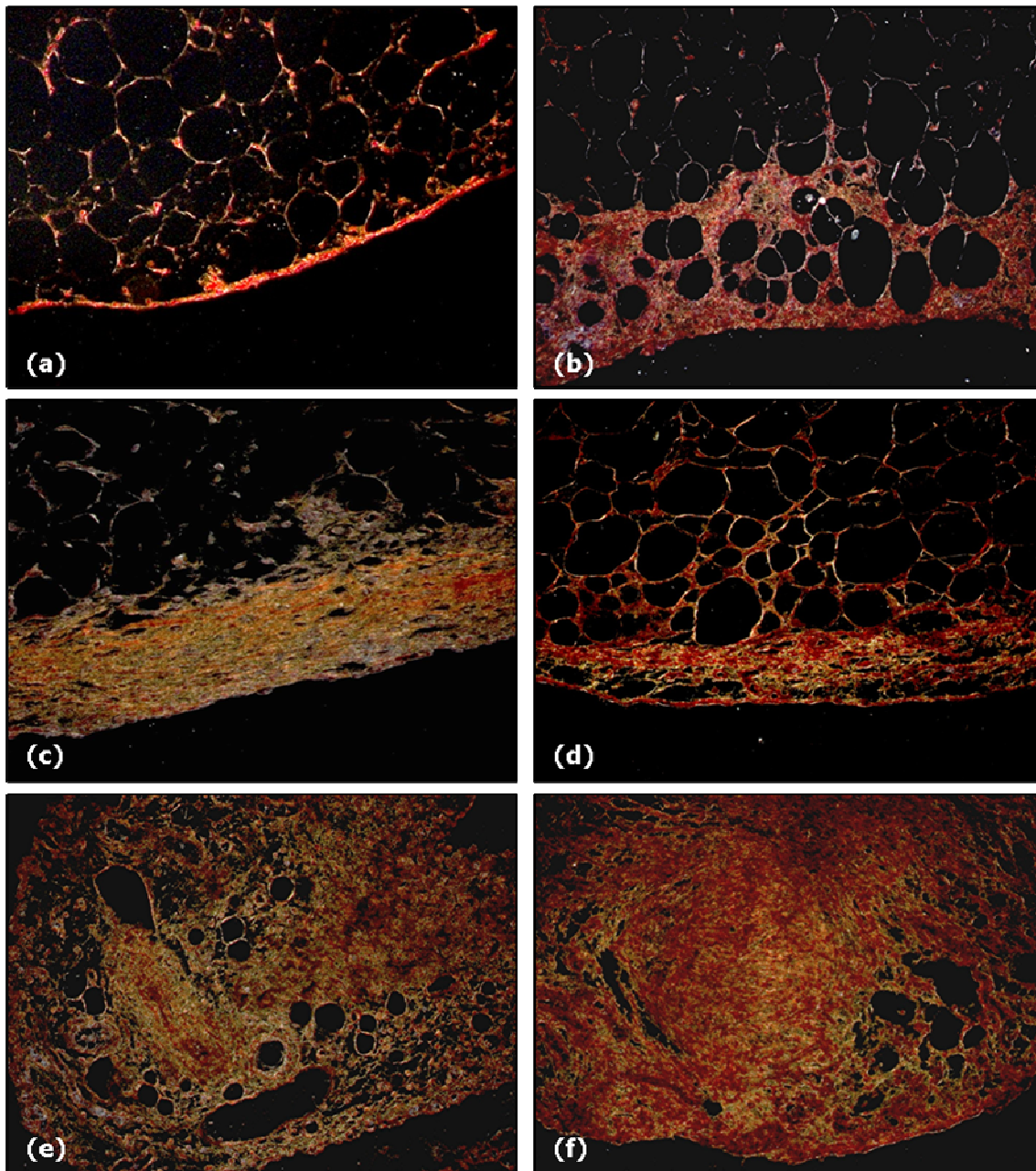


Figura 32: Tinción con rojo Sirio para la observación de la distribución de colágeno III o colágeno inmaduro (amarillo-verde) y de colágeno I o colágeno maduro (rojo) en el omentum y en el tejido adherencial (200x). (a) En el omentum control se observaba el tejido adiposo que lo constituye, cubierto de una delgada lámina mesotelial; (b) En las adherencias de 3 días se apreciaba un engrosamiento del mesotelio/submesotelio, así como la proliferación de las células que lo constituyen; (c) En las adherencias de 7 días que se mantenía la predominancia del tejido adiposo, se observaba el depósito de colágeno tipo III en el submesotelio; (d) A 14 días, predominaba el componente colágeno maduro en el submesotelio; (e) Las adherencias de 7 días de composición fibrosa mostraban grandes cantidades de colágeno inmaduro (tipo III) en su MEC, mientras que el colágeno tipo I quedaba limitado al área vascular; (f) Las adherencias de predominancia fibrosa mostraban, a 14 días, la maduración progresiva del colágeno de la matriz.

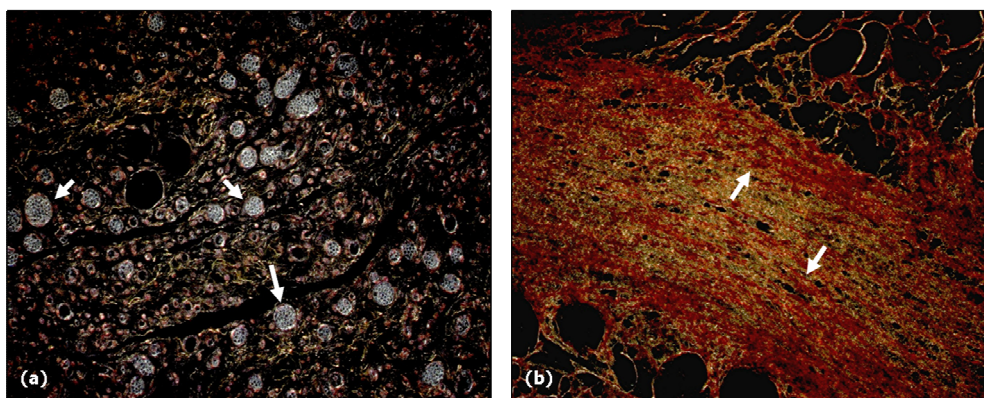


Figura 33: Tinción con rojo Sirio (200x). (a) Adherencia de 7 días Se muestra una zona con elevado número de microvasos (→) inmersos en una matriz con escaso componente fibrilar, correspondiente a colágeno inmaduro (colágeno tipo III); (b) Adherencia de 14 días. Se observa la presencia de haces de colágeno maduro (colágeno tipo I) formando parte de una MEC ordenada correspondiente, probablemente, a una zona con presencia miofibroblástica.

3.1.2.3.5 Componente elástico

En el omentum, la presencia del componente elástico quedaba limitada al área vascular y a las láminas elásticas existentes en el submesotelio del omentum nativo.

En las adherencias de 3 días, destacaba la presencia de vasos con láminas elásticas en el espacio submesotelial, así como en el componente fibroso de las tunicas media y adventicia. El marcaje de la orceína en las adherencias de 7 y 14 días se reducía a láminas elásticas del territorio vascular y a una mínima presencia de fibras elásticas presentes en la matriz extracelular, mostrando el desarrollo y predominio del componente colágeno sobre el componente elástico en estos momentos.

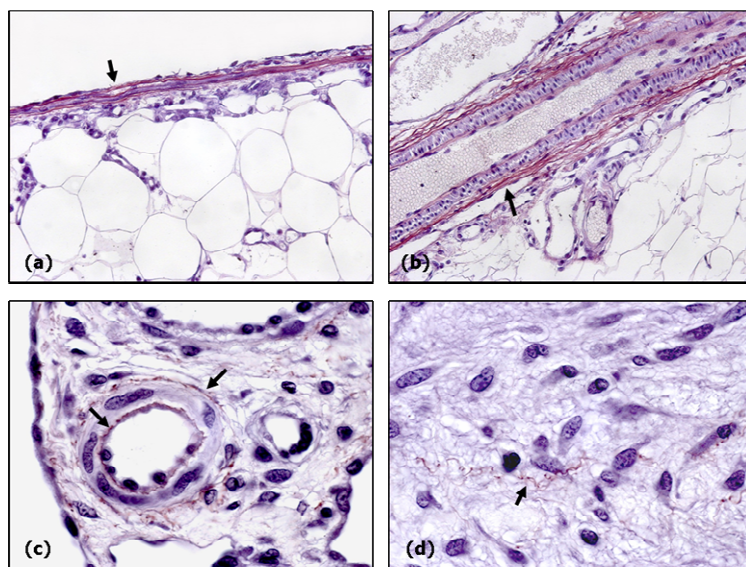


Figura 34: Tinción con orceína. (a) Presencia de láminas elásticas en el submesotelio de una adherencia de 3 días (320x); Esta técnica ponía de manifiesto las láminas elásticas características de los vasos sanguíneos en (b) adherencia de 3 días, 320x y (c) membrana translúcida en una adherencia de 14 días, 1000x; (d) Escasa presencia de fibras elásticas en la MEC de una adherencia de 14 días (1000x)

3.1.2.3.6 CD31

El marcador específico de células endoteliales, CD31, se observó como una cubierta continua en la lámina endotelial vascular. El estudio de este marcador nos permitió diferenciar entre las zonas de reposo y las zonas activadas. En el tejido adiposo en reposo, la presencia de este marcador destacaba la presencia de vasos de gran tamaño, similares a los que presentaba el omentum, mientras que en el caso de las zonas más activadas, en proceso de remodelación y con células en proliferación, se encontraba una gran cantidad de yemas vasculares y vasos muy numerosos de menor tamaño, incluidos los de los GO.

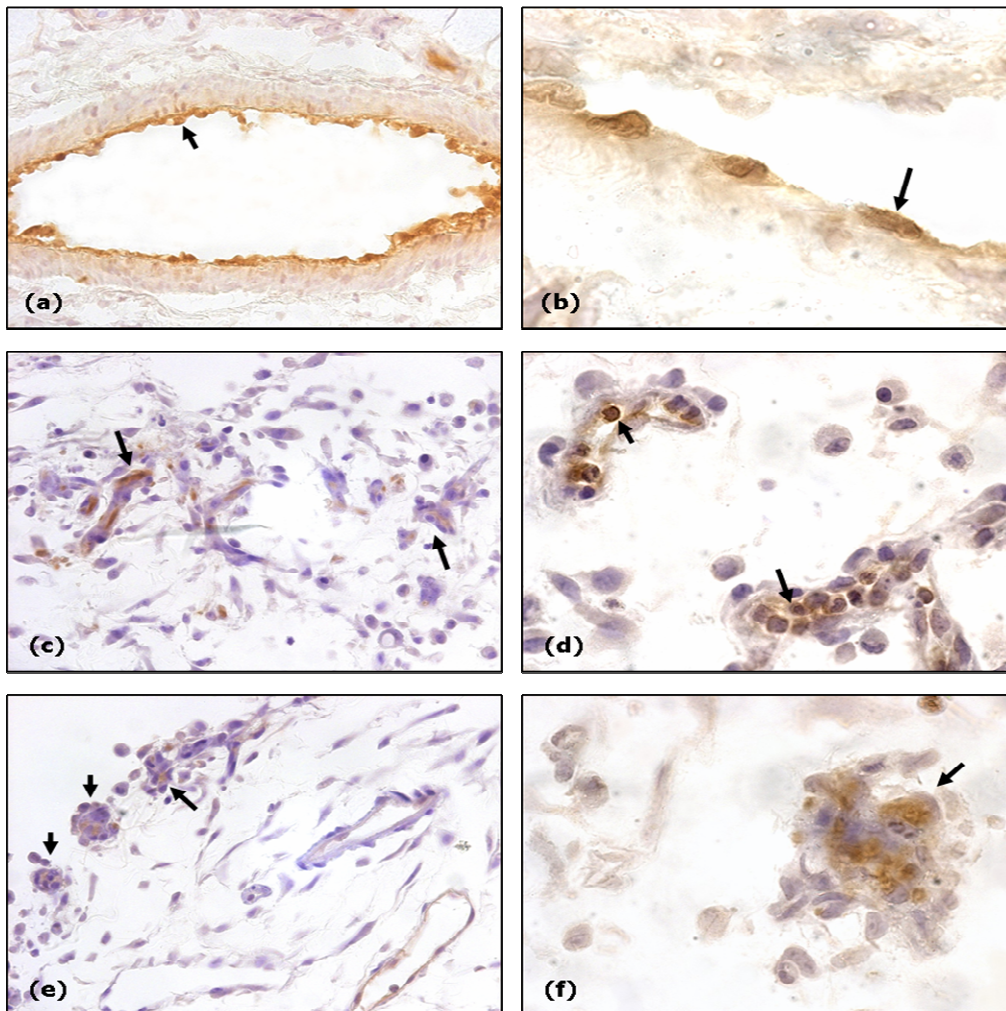


Figura 35: Células positivas para CD31 (→) en las adherencias de 7 días. (a) Adherencia de morfología adiposa. Se observó el marcaje a nivel del endotelio vascular (400x); (b) Detalle del marcaje en las células que constituían el endotelio (1600x); (c) Adherencia de composición fibrosa. Se observan numerosos microvasos inmersos en una matriz que carece de tejido adiposo (400x); (d) Se observaban células inflamatorias en las zonas donde aparecían los microvasos (1000x); (e) Se observó la presencia de células endoteliales en el interior de los GO de la lámina externa (400x); (f) Detalle de un GO (1000x)

3.1.2.3.7 Marcadores musculares

El análisis de la presencia y distribución de la α -actina de músculo liso nos permitió seguir la evolución del omentum cuando conformaba el tejido adherencial. En condiciones normales, el omentum mostraba positividad para la α -actina a nivel de la célula mesotelial y de la célula de músculo liso componente de la pared vascular.

A los 3 días, el tejido adherencial mostraba un fuerte incremento de la expresión de α -actina de músculo liso en las células mesoteliales, poniendo de relieve el estado reactivo y de activación al que se encontraban sometidas estas células. Al igual que en el tejido omental, este marcador definía nítidamente la totalidad de la trama vascular (**figura 37**).

A los 7 días, el marcaje de la α -actina de músculo liso reveló la aparición de células miofibroblásticas, que mostraban una intensa actividad citoplásmica para este microfilamento (**figura 36**). Las áreas fibrosas mostraban la disposición de dichos miofibroblastos, cuyo citoplasma podía ser identificado de modo individual.

La expresión máxima para este marcador, a nivel miofibroblástico, se alcanzaba a los 14 días. Se encontraban grandes áreas con población miofibroblástica, en zonas muy fibróticas apenas vascularizadas. La disposición de los miofibroblastos nos permitía adivinar el efecto de las fuerzas tensiles o biomecánicas a las que se hallaba expuesta esta formación adherencial (**figura 36**).

El empleo de anticuerpos anti-desmina y anti-miosina puso de manifiesto la presencia de una gran cantidad de vasos sanguíneos, a través del marcaje de las células de músculo liso que componían su capa media (**figura 38**), haciendo que el componente arterial fuera especialmente visible.

Se observó la expresión de estos marcadores en algunas células aisladas, lo que podría indicar el compromiso de éstas hacia la línea muscular, posiblemente en la formación de nuevos vasos sanguíneos.

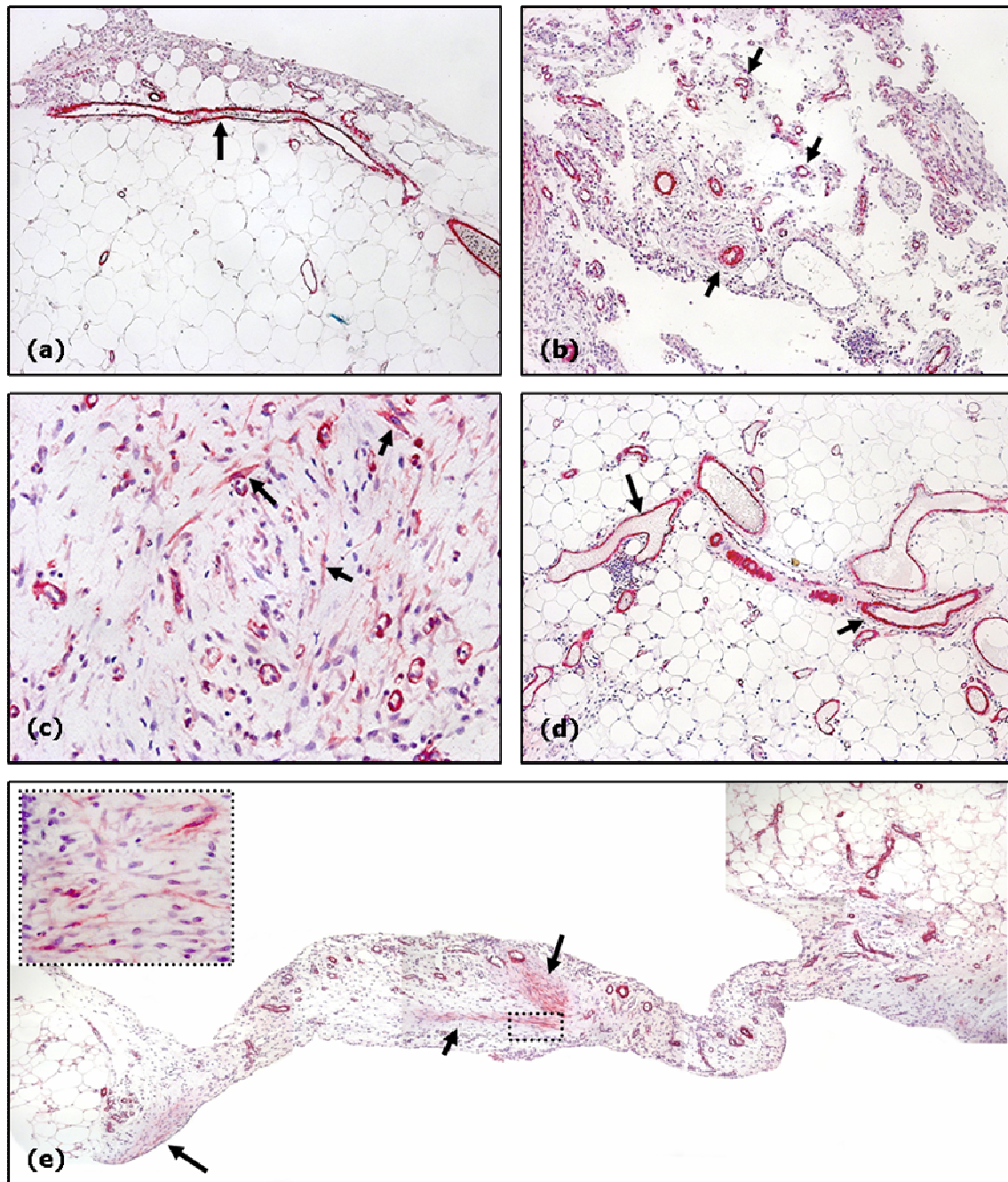


Figura 36: Marcaje inmunohistoquímico para α -actina de músculo liso. (a) Adherencias de 3 días (100x). Presencia de un vaso bajo el submesotelio; (b) Adherencia de 7 días (100x). Se observó la aparición de gran cantidad de microvasos, incluso en zonas donde tan sólo se observaban células de morfología inflamatoria; (c) Esta técnica nos permitió observar los miofibroblastos que integran una adherencias de 7 días fibrosa (320x); (d) Considerable vascularización en una adherencia de 14 días adiposa (100x); (e) Montaje (aumento original, 100x) en el que se observa engrosamiento y fibrosis de la membrana translúcida que une dos lóbulos adiposos en una adherencia de 14 días.

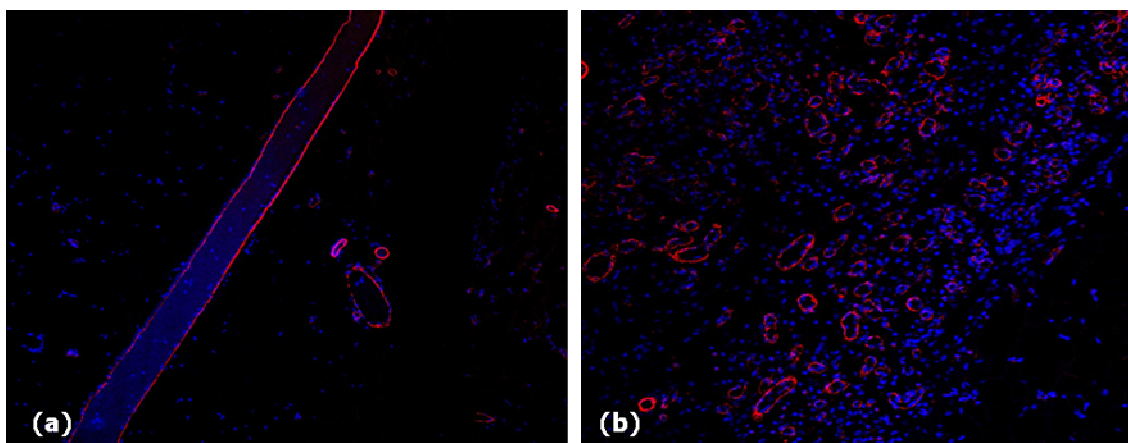


Figura 37: Marcaje de inmunofluorescencia confocal para α -actina de músculo liso (en rojo). El núcleo de las células aparece en color azul debido al marcaje con DAPI (a) Adherencia de 3 días (100x); (b) Adherencia de 14 días. Se observaba un incremento en el número de células e intensa neoangiogénesis en este momento (200x).

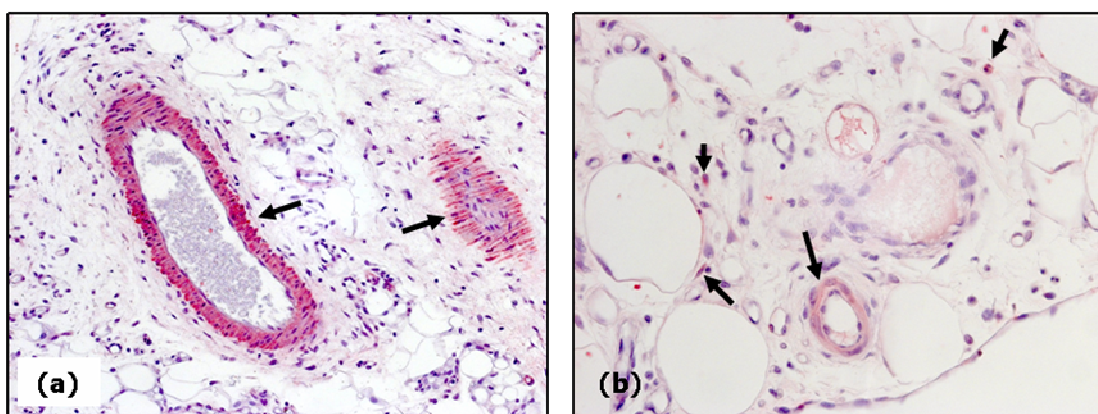


Figura 38: Expresión de miosina (a, 200x) y desmina (b, 400x) en tejido adherencial de 14 días.

3.1.2.3.8 Células pluripotentes

El empleo de los anticuerpos Nanog y Oct-3/4 nos permitió observar un escaso número de células con características de pluripotencialidad en el omentum control. Este número se incrementaba en el tejido adherencial, a menudo en células con morfología de célula inflamatoria (**figura 39**). La presencia de células positivas para Nanog era máxima a los 7 días, especialmente en las áreas que tapizan la adherencia y en los GO. El Oct-3/4, factor de transcripción nuclear, era observado prácticamente en todas las células de la capa mesotelial (**figura 39**) que limitaba con la cavidad peritoneal, además de en los GO. Mostraba, de la misma manera, el máximo número de células positivas a los 7 días.

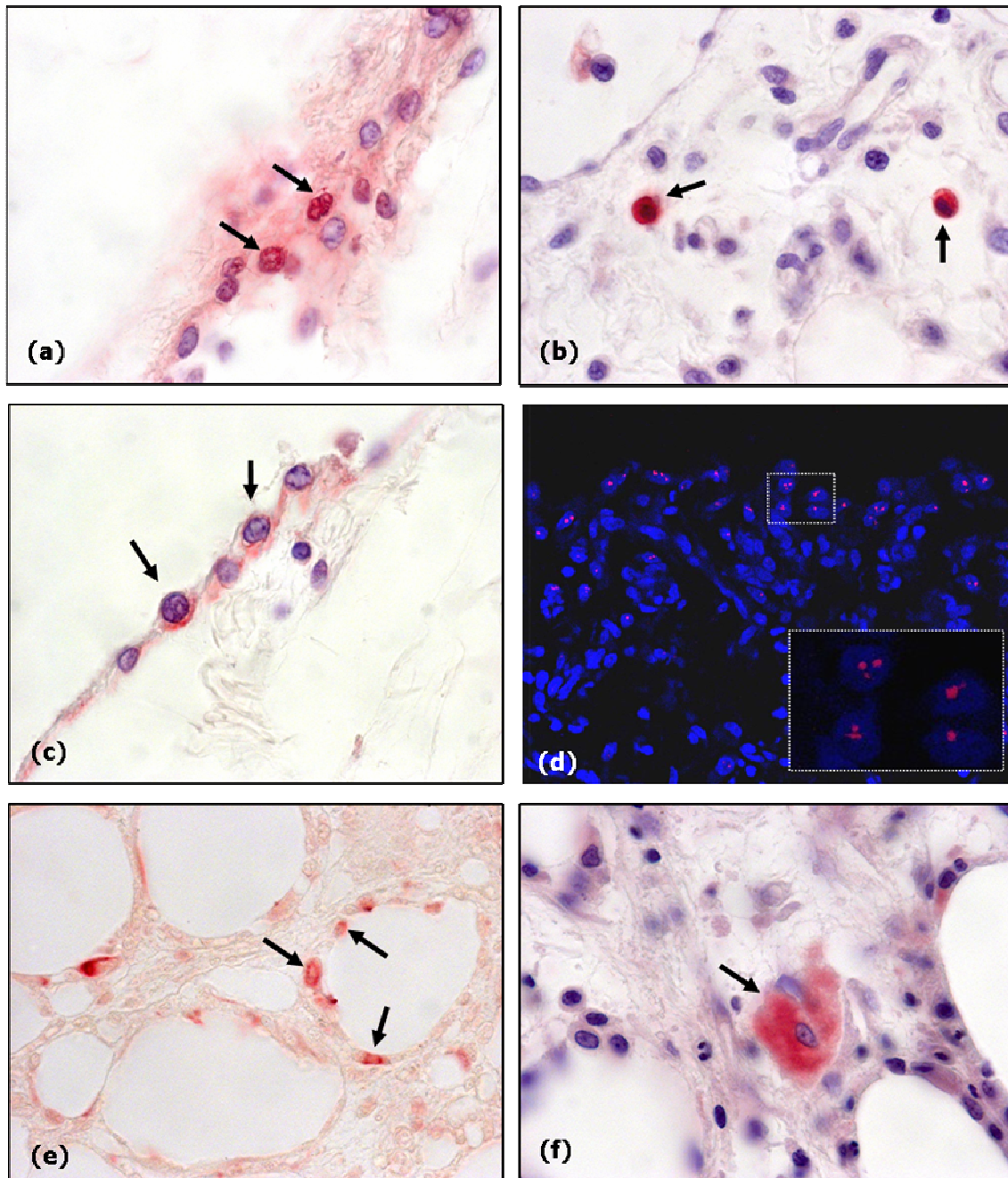


Figura 39: Expresión de los marcadores embrionarios Nanog (a y b) y Oct 3/4 (c, d, e y f) en adherencias de 3 días (a, 1000x), 7 días (b, c y d; 1000x) y 14 días (d y e; 630x); (f) Imagen de microscopía confocal. La técnica de inmunofluorescencia nos permitió apreciar la expresión de este factor de transcripción en el interior de los núcleos celulares. Aparecía especialmente en células de las capas más externas del tejido.

3.1.2.4 WESTERN BLOT

Los resultados obtenidos mediante Western blot mostraron una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en los niveles de LAP-TGF β 1 encontrados en las adherencias de 7 días de madurez con respecto a las adherencias de 3 días de madurez, cuyos valores son similares a los encontrados en el omentum nativo. Las diferencias entre el resto de los grupos de estudio no alcanzaba la significación ($p > 0.05$) (**figura 40a**).

La utilización del anticuerpo específico para la forma madura del TGF- β 1 reveló varias bandas. La banda correspondiente al monómero de la forma activa del TGF- β 1 en condiciones reductoras (12.5 KDa) aparecía con muy poca intensidad, prácticamente imperceptible, dificultando el posterior análisis por densitometría. Sin embargo, se encontraron otras bandas de mayor peso molecular e intensidad. Se observó una banda de 55 KDa y un doblete de 110 KDa, probablemente correspondientes al pro-TGF β y su dímero, respectivamente. Se observaron dos bandas de menor intensidad de pesos moleculares entre 75-90 KDa. La banda más intensa en todos los grupos aparecía a 100 KDa (**figura 40b**), y podría corresponder al dímero de la forma madura del TGF- β 1 unido a uno de sus receptores. Ya que el TGF- β 1 requiere de la unión a sus receptores para ejercer su función biológica, se eligió esta banda para la realización del análisis densitométrico como indicativo del TGF- β 1 activo.

El análisis estadístico reveló que tan sólo a los 3 días tras la cirugía ya se observaba un aumento en los niveles de TGF- β 1 activo en las adherencias con respecto al omentum control. Se encontraban niveles significativamente superiores ($p < 0.05$) de TGF- β 1 activo en las adherencias de 7 días con respecto al resto de los grupos de estudio, coincidiendo con el tiempo en el que las adherencias mostraban los niveles más bajos de la forma latente del TGF- β 1. Esto indicaba que, a este tiempo de estudio, se producía una activación del TGF- β 1. A los 14 días, los niveles de TGF- β 1 activo disminuían de manera que eran estadísticamente no significativos ($p > 0.05$) con respecto a los hallados para el omentum nativo (**figura 40b**), lo que indicaba que, transcurridas dos semanas, los niveles de este factor de crecimiento volvían a los niveles basales.

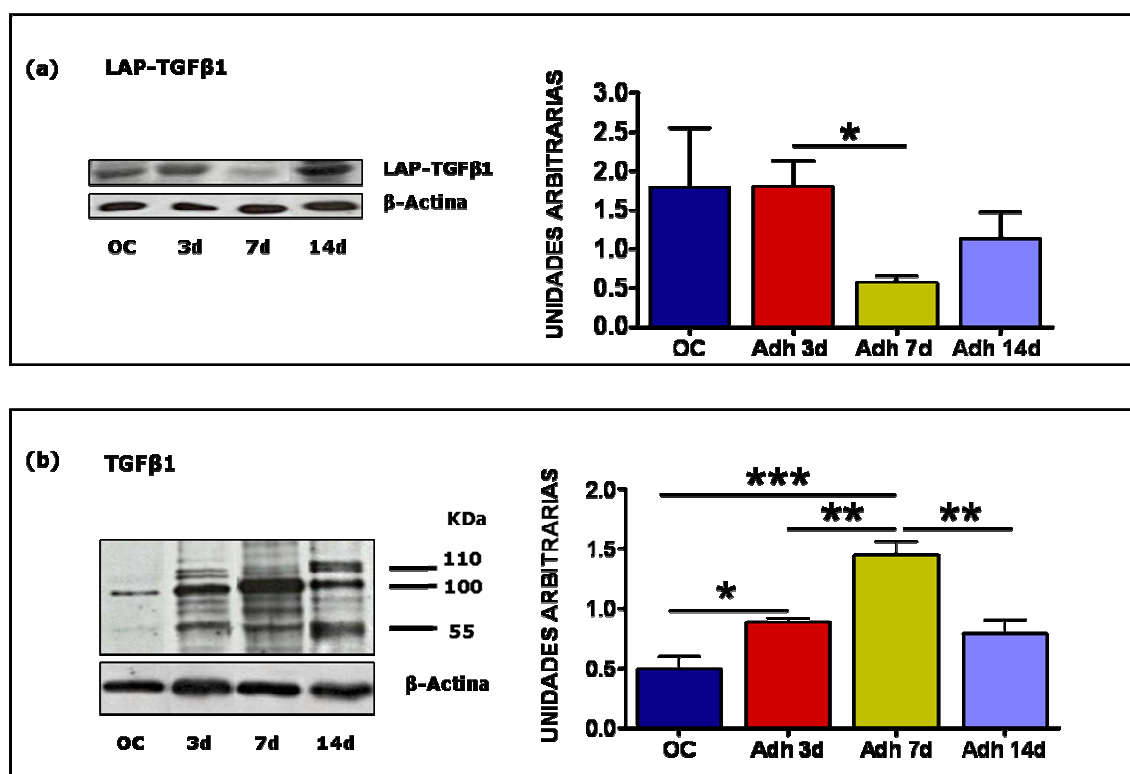


Figura 40: (a) Resultados de Western blot para la forma latente del TGF-β1; (b) Resultados de Western blot para la forma activa del TGF-β1. Las bandas sometidas al análisis por densitometría fueron las correspondientes a 100 kDa.

Las gráficas muestran la media \pm desviación estándar para cada grupo de estudio. Como control de carga se incubaron las membranas con el anticuerpo β-actina y la intensidad de sus bandas fue utilizada para normalizar los valores obtenidos para las formas latente y activa de TGF-β1. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p > 0.005$).

3.1.2.5 RT-PCR

mRNA de TGF-β1

Nuestros resultados mostraron un aumento significativo ($p < 0.05$) en la cantidad relativa de TGF-β1 mRNA en las adherencias de 3 días con respecto al omentum nativo, coincidiendo con el aumento de la proteína observado mediante el Western blot. A 7 días, la cantidad relativa de mRNA de TGF-β1 era similar a los valores basales, pasando a mostrar el mayor valor a los 14 días (figura 41).

mRNA de VEGF

Los estudios de la actividad del gen de VEGF nos mostraban que, al igual que ocurría con el TGF-β1, el momento de mayor expresión corresponde a los 14 días.

Encontrábamos que el omentum, en condiciones normales, mostraba una elevada expresión del gen. Entre la primera y segunda semana de evolución, la cinética de expresión conducía al restablecimiento de los niveles basales (**figura 41**), coincidiendo, posiblemente, con la consolidación definitiva de las adherencias.

mRNA de Colágeno I

Los resultados obtenidos para el colágeno I reflejaban las observaciones realizadas mediante la técnica inmunohistoquímica y la tinción con rojo Sirio. Se observaba un aumento progresivo de la cantidad de mRNA de colágeno I en el tejido adherencial, alcanzando su máxima expresión a los 14 días. El aumento en la cantidad relativa de mRNA de colágeno I se producía de forma paulatina, no siendo significativo entre las adherencias de 3 y 7 días y el omentum control, pero sí cuando este último era comparado con las adherencias de 14 días ($p < 0.01$) (**figura 41**).

mRNA de Colágeno III

La máxima expresión de las cantidades relativas de mRNA de colágeno III se encontraron en las adherencias de 7 días (**figura 41**). Este hecho se correspondía con los depósitos de este tipo de colágeno encontrados en ese momento mediante técnicas inmunohistoquímicas y tinción con rojo Sirio. La disminución de la tasa de mRNA de colágeno III a los 14 días coincidía con el pico de expresión encontrado para el mRNA de colágeno I, lo que indicaría que la presencia de colágeno I a este tiempo se debe no solamente a la maduración del colágeno III encontrado a tiempos anteriores, sino también a un aumento de su expresión génica.

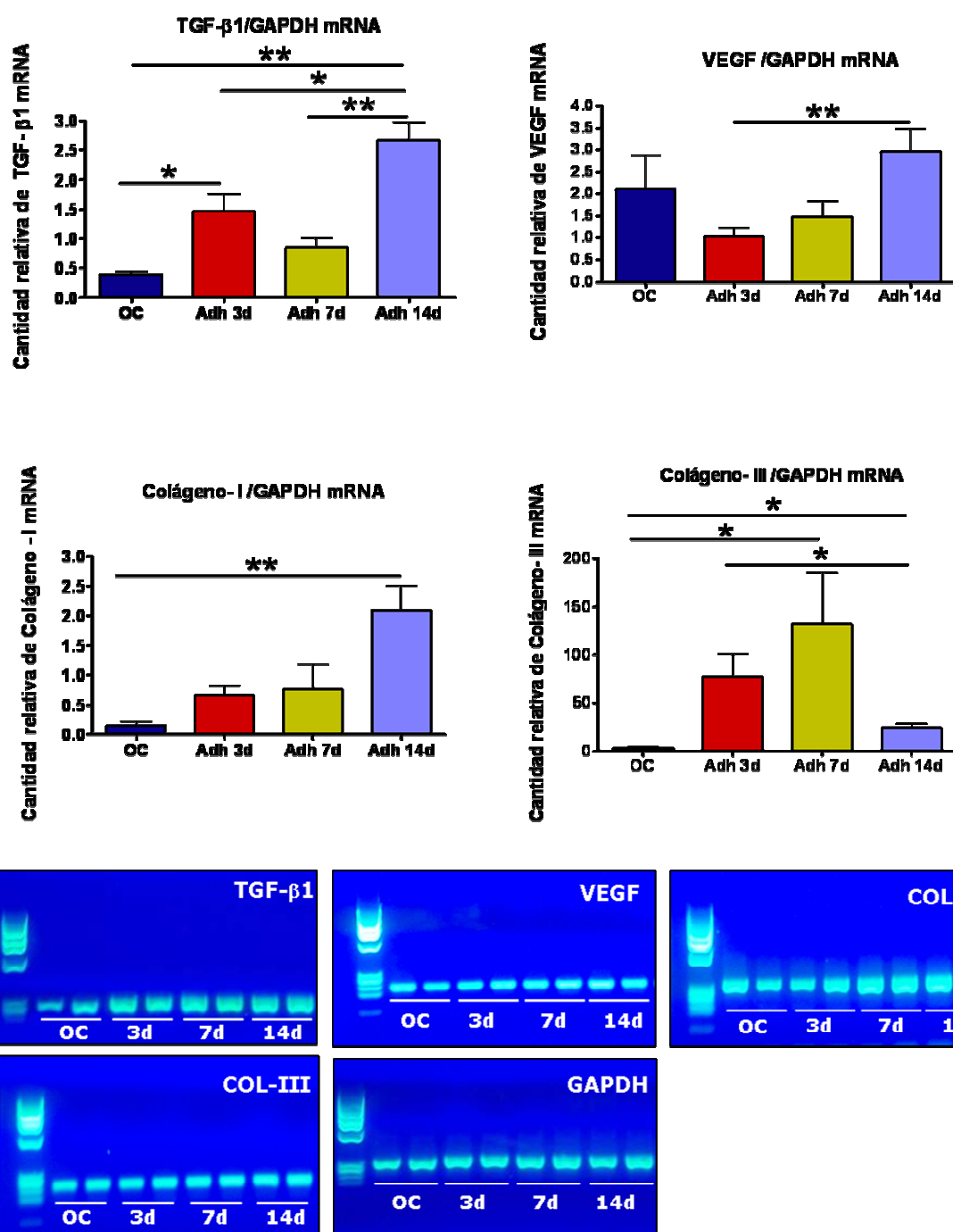


Figura 41: Cantidades relativas de mRNA de los genes TGF-β1, VEGF, colágeno I y colágeno III, normalizadas con la expresión del gen de referencia GAPDH (*p<0.05, **p<0.01) y productos de RT-PCR de los genes del TGF-β1 (271 pb), VEGF (211 pb), Colágeno I (312 pb), Colágeno III (255 pb) y GAPDH (293 pb). Se observó la presencia de un solo producto para cada par de cebadores empleados.

Resumen de resultados

	Omentum Control	Adherencias (3 días)	Adherencias (7 días)		Adherencias (14 días)	
			Región Fibrosa	Región Adiposa	Región Fibrosa	Región Adiposa
Macrófagos activados	0,03%	19,31%	9,62%	14,90%	6,81%	14,6%
Linfocitos B activados	0%	0,5%	1,5%	4,5%	0,05%	0,05%
Linfocitos T CD4 activados	0%	0,35%	1,5%	4,5%	0,10%	0,10%
Linfocitos T CD8 activados	0%	3,78%	1%	3%	0,13%	0,13%

Tabla 11: Porcentaje de células activadas

	Omentum Control	Adherencias (3 días)	Adherencias (7 días)		Adherencias (14 días)	
			Región Fibrosa	Región Adiposa	Región Fibrosa	Región Adiposa
LAP-TGFβ1	+++	+++	+	+	+++	+
TGFβ1	+/-	++	+++	+	++	+
TGFβ3	+	++	+	++/+++	+	++
Betaglicano (soluble)	+	+++	-/+	-/+	+	++
Betaglicano (anclado)	-	+	+++	+	+	+++
VEGF	++/+++	++	+++	+++	+/++	+/++
α-actina de músculo liso	+/-	+	+++	+	+++	+
Colágeno III	+	++	+++	+	+	++
Colágeno I	+	+	+	+	+++	++
mRNA TGFβ1	+/-	++	+		+++	
mRNA VEGF	++/+++	+	++		+++	
mRNA colágeno III	+/-	++	+++		+	
mRNA colágeno I	+/-	+	+		+++	

Tabla 12: Valores semicuantitativos relativos a la expresión mostrada por el omentum control para cada marcador o gen. Escala utilizada: -, ausencia; +/-, mínima presencia; +, presencia moderada; ++, presencia intensa; +++, máxima presencia.

3.1.3 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos permitieron establecer la evolución del omentum cuando se encontraba formando parte de una adherencia. Una vez que se producía la adhesión al biomaterial (adherencia de 3 días), el tejido ponía en marcha mecanismos de respuesta inflamatoria e inmune (macrófagos y linfocitos T CD8+), y se iniciaba lentamente la activación del resto de los parámetros conducentes a la cicatrización.

Esta respuesta conllevaba el despertar de los mecanismos inflamatorios e inmunes (linfocitos T CD4+ y B) que se observaron a los 7 días, seguidos de una respuesta celular con activación y proliferación de células mesenquimales (marcadores Oct-3/4 y Nanog) y abundante secreción de matriz extracelular (colágeno III), con una significativa respuesta angiogénica (VEGF y CD31). Es decir, a 7 días el tejido adherencial mostraba un perfil inflamatorio, inmune y proliferativo, e iniciaba los procesos de diferenciación celular.

La consolidación del tejido se observó a los 14 días, con ausencia de reactividad tisular y características de consolidación y maduración, como lo demostraba el cambio de expresión de colágeno III a colágeno I, tanto a nivel génico como proteico, y el incremento en la expresión de α -actina de músculo liso necesaria para el incremento de la capa muscular de los vasos y en áreas consolidadas con miofibroblastos.

Por todo ello, de los tres tiempos de estudio elegidos, era el día 7 en el que el tejido adherencial podía considerarse en su máximo nivel de actividad tisular. Por eso, se consideró este momento como el punto de inflexión hacia una irreversibilidad en la adhesión establecida al biomaterial.

Definimos, por tanto, el tejido adherencial de 7 días como el tejido a considerar para nuestro próximo objetivo, que consistió en la obtención de la población celular constituyente de dicho tejido y las características que esta población podía mostrar *in vitro*.

Así, podemos concluir que:

- 1) En nuestro modelo, el omentum mayor forma, en todos los casos, una adherencia sobre el biomaterial implantado. Esta adherencia ha sido el objeto de nuestro estudio.
- 2) El estudio temporo-secuencial nos permitió demostrar que el momento de inflexión en la diferenciación adherencial tenía lugar a los 7 días de la

formación adherencial. La presencia y localización tisular de las células inflamatorias (estructurada en los GO o dispersa) y el balance $\text{TGF-}\beta 1/\text{TGF}\beta 3$ aparecían como parámetros directamente implicados en la diferenciación del tejido de granulación inicial hacia tejido adiposo o fibroso como componentes mayoritarios de la adherencia estabilizada.

- 3) Se definió el tejido adherencial de 7 días como la fuente celular más apropiada para los posteriores estudios *in vitro* de caracterización del fenotipo celular.

3.2 SEGUNDO OBJETIVO

En este segundo objetivo, tras el diseño de un protocolo de extracción de las células constituyentes del tejido adherencial y del omentum control, nos propusimos estudiar:

- 1) Las diferencias proliferativas y de comportamiento entre ambas poblaciones en cultivo. A la vista de los resultados obtenidos en el primer objetivo, las células procedentes de las adherencias se estudiaron a partir del tejido adherencial obtenido 7 días post-cirugía. Pensamos que este era el momento óptimo para estudiar las células integrantes de este tejido y poder conocer su naturaleza y el potencial de diferenciación que muestran *in vivo*.
- 2) El compromiso de las células de las adherencias hacia un fenotipo concreto. Se analizó, *in vitro*, el fenotipo alcanzado por las células de las dos regiones observadas en el primer objetivo: zonas de componente mayoritariamente adiposo y zonas de composición fibrosa.

3.2.1 MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1.1 ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Fueron empleados 5 conejos blancos Nueva Zelanda, machos, de un peso aproximado de 3000-3200 g al comienzo del estudio. Los animales fueron mantenidos bajo las condiciones descritas en el primer objetivo, conforme a la Normativa Internacional vigente sobre animales de experimentación (CEE 2871-22 A9).

3.2.1.2 GRUPOS DE ESTUDIO

GRUPO I (CONTROL) (n=6): El grupo control consistió en células obtenidas a partir de tejido omental procedente de animales sometidos al implante de la malla. En todos los casos se empleó tejido no involucrado en la formación adherencial y alejado de la malla. El estudio de esta población nos permitió estudiar el comportamiento y fenotipo de las células omentales activadas por la presencia de un biomaterial en la cavidad peritoneal.

GRUPO II (n=6): Consistió en células obtenidas a partir de tejido adherencial formado entre la prótesis de polipropileno y el omentum del animal, obtenido 7 días tras

la colocación de la prótesis. Se estudiaron, por separado, aquellas células procedentes de adherencias mayoritariamente fibrosas y de adherencias mayoritariamente adiposas.

3.2.1.3 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

La preparación de todos los medios de cultivo se realizó en condiciones estériles tal y como se indica a continuación:

3.2.1.3.1 *Medio mínimo esencial (MEM)*

Se reconstituyeron 9,53 g de MEM (Gibco, Invitrogen) en 1 litro de agua bidestilada a la que se añadió 2,2 g de bicarbonato sódico (NaHCO_3). Una vez que estas dos sustancias estaban completamente disueltas, la solución se pasó a través de un filtro de 0,22 μm de porosidad (Stericup[®], Millipore).

A continuación se añadió un 1% (v/v) de una solución de antibiótico/antimicótico (Gibco, Invitrogen) que contenía: 10 000 U/mL de penicilina G sódica, 10 000 $\mu\text{g/mL}$ de sulfato de estreptomicina y 25 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B (Fungizona).

El medio así preparado se mantuvo a 4° C hasta su utilización.

3.2.1.3.2 *DMEM (Dulbecco 's Modified Eagle Medium High Glucose)*

El medio DMEM (Gibco, Invitrogen) empleado contenía 4.5 g/L de D-glucosa, L-glutamina y 25 mM HEPES, en ausencia de piruvato sódico y suero. Se suplementó con un 1% de antibióticos/antimicóticos (Gibco, Invitrogen). Se mantiene a 4°C.

3.2.1.3.3 *Medio M-199*

Se reconstituyeron 9,82 g de M-199 (Gibco, Invitrogen) en 1 L de agua ultrapura, se añaden 2,2 g de bicarbonato sódico y se pasó a través de un filtro de 0,22 μm de porosidad (Stericup[®], Millipore). El medio de cultivo se suplementó con un 20% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco, Invitrogen); un 1% de antibióticos/antimicóticos; un 1 % de L-Glutamina (Gibco, Invitrogen) y un 1% de Factor de crecimiento epitelial (EGF) (Sigma).

3.2.1.3.4 Medio de cultivo AmnioMAX™

Se reconstituyeron 450 mL de medio basal AmnioMAX-C100 (Gibco, Invitrogen) con 75 mL de suplemento AmnioMAX-C100 Supplement (Gibco). A esta solución se le añadieron 5 mL de antibiótico/antimicótico (Gibco, Invitrogen): 10 000 U/mL de penicilina G sódica, 10 000 µg/mL de sulfato de estreptomicina y 25 µg/mL de anfotericina B (Fungizona).

Se mantuvo a 4° C.

3.2.1.3.5 Solución de lavado HBSS 1X

Como solución de lavado para los cultivos celulares se empleó HBSS 1X, preparado a partir de la solución comercial HBSS 10x (Hank's Buffer Saline Solution, sin calcio ni magnesio) (Gibco, Invitrogen) mediante disolución de 10 mL de ésta en 90 mL agua destilada estéril.

3.2.1.4 PREPARACIÓN DE ENZIMAS

3.2.1.4.1 Colagenasa

Se reconstituyeron 100 mg de colagenasa tipo I (Gibco, Invitrogen) en 100 mL de MEM a los que se añadieron 1,5 mL de cloruro cálcico (CaCl₂) 1M. Esta solución se esterilizó por filtración a través de un filtro Acrodisc Syringe Filters (Pall Gelman Laboratory) de 0,2 µm de porosidad.

La solución se alicuotó en tubos de 10 mL y se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

3.2.1.4.2 Tripsina-EDTA 1X

La tripsina-EDTA 1X se obtuvo mediante disolución de 10 mL de tripsina-EDTA 10X comercial (Gibco, Invitrogen) en 90 mL de HBSS 1X (Hank's Buffer Saline Solution, sin calcio ni magnesio).

La solución se alicuotó en tubos de 10 mL y se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

3.2.1.5 PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE CÉLULAS A PARTIR DE TEJIDO ADHERENCIAL

Para la realización de los cultivos celulares se obtuvieron biopsias de tejido adherencial que fueron diseccionadas, en pequeños explantos, mediante disgregación mecánica en condiciones de esterilidad (**figura 42**). Para ello, el proceso de extracción se realizó en el interior de una campana de flujo laminar clase II TELSTAR AV 30/70 (Müller 220 V 50 MHz).

Con ayuda de una pipeta Pasteur, los explantos fueron transferidos sobre la superficie de cultivo de frascos de 25 cm², que contenían 1 ml de medio de cultivo (AmnioMAX™; Invitrogen, Barcelona) había añadido previamente (**figura 42**). Este proceso se realizó cuidadosamente, evitando rayar la superficie del frasco. Los frascos de cultivo se incubaron en posición vertical en una estufa de incubación (Forma Scientific, Hucoa-Erlöss) a 37°C, en una atmósfera con un 5% CO₂ durante 1 hora, para favorecer la adhesión de los explantos a la superficie de cultivo. Transcurrido este tiempo, los frascos fueron colocados en posición horizontal para permitir la expansión celular a partir de los pequeños explantos cultivados.

Los frascos de cultivo fueron incubados, bajo las condiciones descritas anteriormente, hasta alcanzar un estado de semiconfluencia (75% - 90% de superficie cubierta). En ese momento, las células fueron tratadas con 1.5 ml de tripsina-EDTA 1X (Invitrogen, Barcelona) y subcultivadas a razón de 1:4. Las células procedentes de este subcultivo fueron sometidas a ensayos de proliferación y viabilidad celular y caracterización celular mediante técnicas de inmunofluorescencia y Western blot.

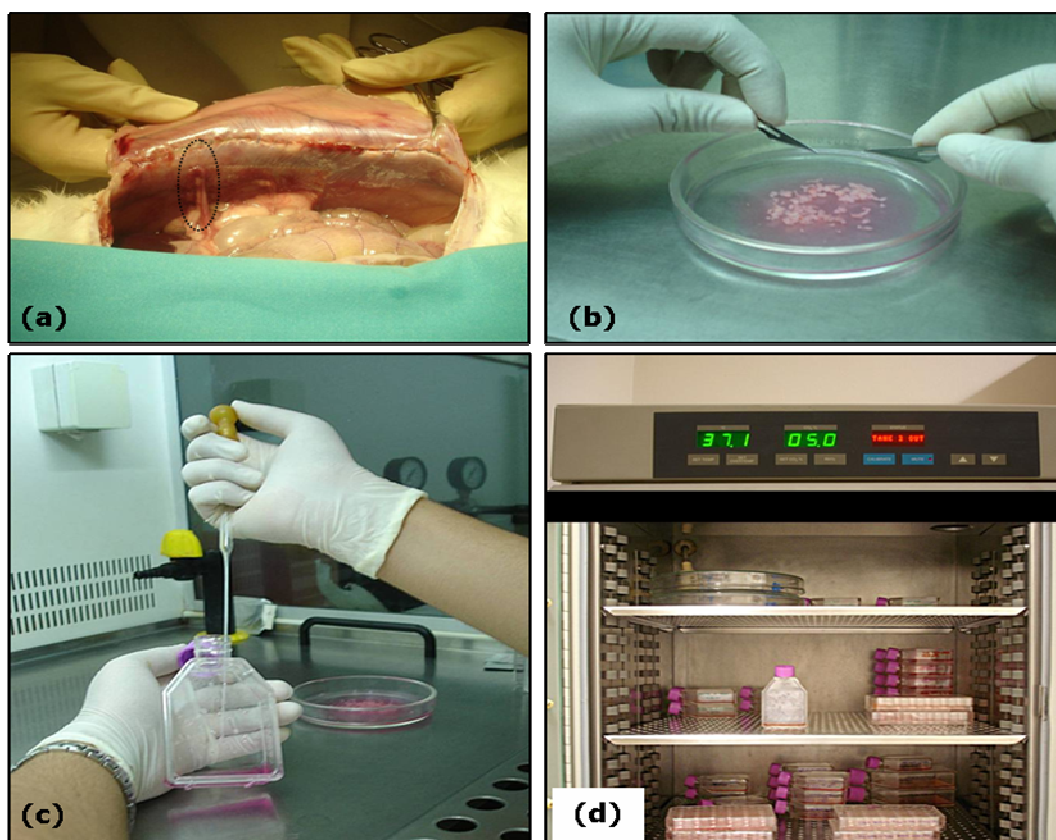


Figura 42: Técnica de obtención de células a partir de tejido adherencial. (a) Recogida del tejido adherencial; (b) Disgregación mecánica del tejido; (c) Transferencia de los explantos sobre la superficie de cultivo; (d) Incubación de los explantos en posición vertical para facilitar su adherencia a la superficie de cultivo.

3.2.1.6 AISLAMIENTO DE CÉLULAS PROCEDENTES DEL OMENTUM

Para el aislamiento de las células omentales, se emplearon fragmentos de 20-25g de omentum, procedentes del animal de experimentación. Fueron transportados hasta el laboratorio, sumergidos en medio mínimo esencial (MEM, Invitrogen, Barcelona), para ser procesados bajo condiciones estériles (**figura 43**). El tejido fue lavado varias veces en MEM para retirar las células sanguíneas extravasadas en el proceso de la disección e incubado en una suspensión de colagenasa tipo I (Gibco, Invitrogen), al 0.1% en MEM, a 37° C en un baño de agitación durante 20 minutos.

Posteriormente, el tejido fue lavado en 20 mL de MEM que se recogió junto con la suspensión de colagenasa que contenía las células omentales. Esta suspensión celular fue centrifugada a 1050 rpm durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 ml de MEM basal, volviéndose a centrifugar en las mismas condiciones. Este proceso de lavado se realizó tres veces para la eliminación de los componentes sanguíneos liberados durante la digestión enzimática.

Posteriormente, las células fueron resuspendidas en 3 ml de medio de cultivo (AmnioMAXTM; Invitrogen, Barcelona) y trasvasadas a frascos de cultivo de 25 cm² de superficie (**figura 43**). Los frascos fueron incubados a 37° C en estufa de CO₂ hasta alcanzar un estado de semiconfluencia, momento en el que fueron tratados con 1.5 ml de tripsina-EDTA 1X y subcultivados a razón de 1:4. El seguimiento de los cultivos celulares se realizó en un microscopio invertido Axiovert 40C (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), que llevaba acoplado un sistema de imagen digital Axiocam ICc1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) (**figura 44**). Las células procedentes de este subcultivo fueron sometidas a ensayos de proliferación y viabilidad celular y caracterización celular mediante técnicas de inmunofluorescencia y Western blot.

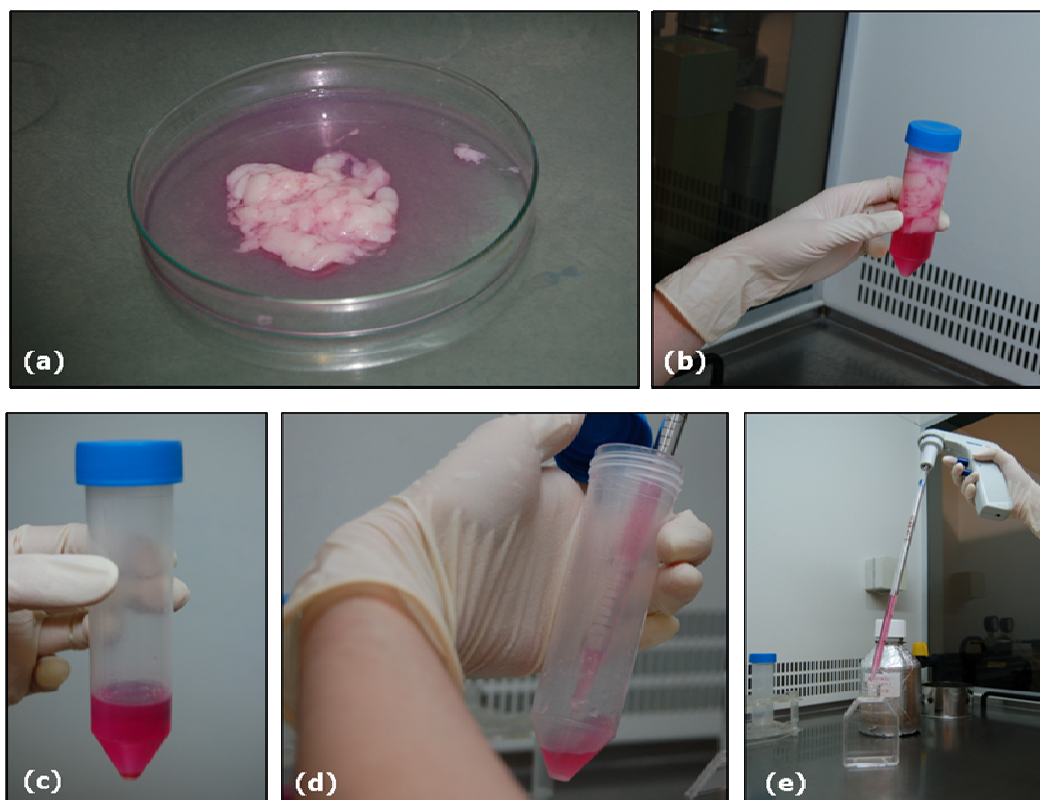


Figura 43: Técnica de extracción de células mesoteliales a partir del omentum. (a) Biopsia de omentum; (b) Adición de collagenasa para su incubación; (c) Pellet obtenido tras la centrifugación de la suspensión celular; (d) Resuspensión del pellet en medio de cultivo; (e) Traspase de la suspensión celular a un frasco de cultivo de 25 cm².

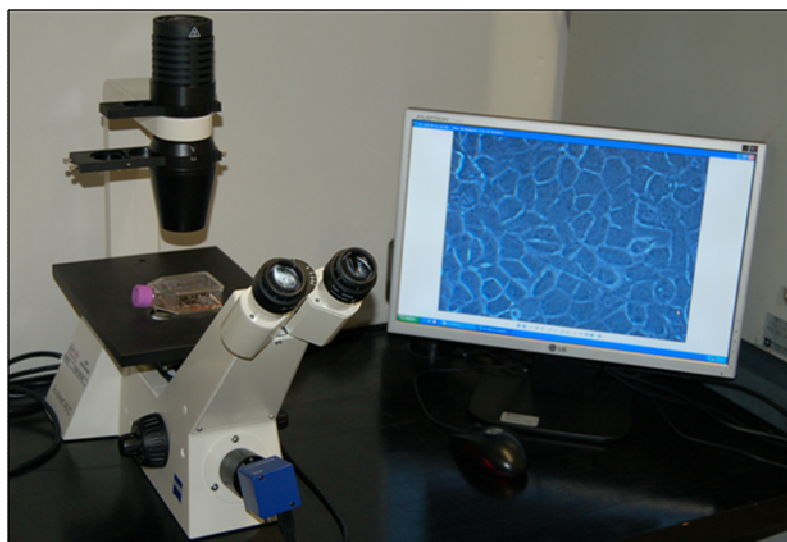


Figura 44: Microscopio invertido Axiovert 40C (Zeiss) utilizado para el seguimiento de los cultivos celulares.

3.2.1.7 ENSAYOS DE RECUENTO CELULAR

Los ensayos de recuento de células viables se realizaron mediante el método de exclusión del azul tripán. El azul tripán es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en su membrana. De esta forma, aquellas células que aparecen teñidas de color azul se consideran células no viables. Y aquellas células no teñidas, las que excluyen el azul tripán, se consideran células viables.

Para cada una de las poblaciones estudiadas (células procedentes de adherencias y células mesoteliales procedentes de omentum), se sembraron 5×10^4 células/frasco de cultivo de 25 cm² de superficie para cada uno de los tiempos de estudio. Los tiempos de estudio establecidos fueron: 1, 2, 3, 4 y 8 días.

Para la determinación del número de células viables, una vez llegado el correspondiente tiempo de estudio, se retiró el medio de cultivo y se lavó la superficie de cultivo con HBSS 1X. Se añadieron 1.5 mL de tripsina-EDTA 1X con los que se incubaron las células durante 5 minutos a 37° C. Una vez transcurrido el tiempo de actuación de la enzima, ésta se inactivó mediante la adición de 3 mL de medio de cultivo AmnioMAX. Se tomó una alícuota de 20 µL de la suspensión celular a la que se añadieron 180 µL de una solución de azul tripán 0.1%, realizando así una dilución 1:10 de la suspensión celular. Con ayuda de una pipeta, se cargó la cámara de Neubauer con esta solución y se procedió al recuento de células viables y no viables mediante microscopía óptica.

La cámara de Neubauer está dividida en 9 cuadrículas (3 x 3). De estas nueve cuadrículas, es sobre las cuatro de las esquinas sobre las que se realizó el recuento. La concentración de células viables fue estimada a partir de la media del número de células presentes en estos cuatro campos. Estas zonas corresponden a 1 mm², y, dado que la depresión central de la cámara de Neubauer está hundida 0.1 mm con respecto a la superficie, el volumen comprendido entre cada una de estas zonas y el cubreobjetos es de 0.1 mm³, es decir, 0.1 µL.

De manera que el número de células por mililitro se obtuvo del resultado de la siguiente fórmula matemática:

$$\text{nº células/ml} = (\text{nº medio de células /cuadrícula de } 0.1 \text{ µL}) \times 10^4 \times \text{factor de dilución.}$$

El factor de dilución en nuestro caso era 10, ya que la suspensión celular se había diluido en proporción 20:180 en azul tripán.

El recuento de células viables fue realizado por dos observadores independientes. Una vez conocido el número de células por mililitro de suspensión celular se calculó el número de células presentes en cada frasco de cultivo de 25 cm².

3.2.1.8 PROLIFERACIÓN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Los ensayos de proliferación por citometría de flujo se realizaron mediante el marcaje de las células con el trazador celular CFSE (carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester). El CFSE difunde de manera pasiva al interior de las células. Es una sustancia incolora y no fluorescente hasta que los grupos acetato son escindidos por esterasas intracelulares produciendo un ester succinimidilo carboxifluoresceína fluorescente. El grupo ester succinimidilo reacciona con las aminas intracelulares, formando conjugados fluorescentes. El exceso de reactivo no conjugado difunde pasivamente al medio extracelular donde puede ser eliminado mediante lavados. Los aductos formados entre las proteínas intracelulares y el trazador son retenidos en las células y repartidos de manera equitativa a las células hijas tras cada replicación celular. De manera que nos permiten realizar el seguimiento del trazador a lo largo de las diferentes divisiones celulares.

Para realizar el marcaje con el trazador, las células fueron levantadas del frasco de cultivo mediante incubación con 1.5 ml de tripsina-EDTA 1X durante 5 minutos a 37° C. Fueron resuspendidas en una solución de PBS/BSA precalentado a 37° C hasta una concentración final de 10⁶ células/ml. Se añadieron 2 µl de una solución stock 5mM de CFSE (CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit - C34554, Molecular Probes, Invitrogen, Barcelona, Spain) por mililitro de suspensión celular. En estas condiciones, se incubaron las células, en oscuridad, durante 10 minutos a 37° C. Transcurrido este tiempo, se detuvo el marcaje mediante la adición de 5 ml de medio de cultivo completo, previamente enfriado en hielo. La suspensión celular se incubó durante 5 minutos en hielo y se centrifugó durante 10 minutos a 1050 rpm. Se lavaron las células 3 veces con medio de cultivo procediéndose a la centrifugación durante 10 minutos a 1050 rpm tras cada uno de los lavados. Finalmente, se resuspendió el pellet en medio de cultivo fresco (AmnioMAX™; Invitrogen, Barcelona, Spain) y se sembraron las células en frascos de cultivo de 25 cm² de superficie (10⁵ células/frasco).

Los tiempos de estudio establecidos fueron: el momento inicial tras el marcaje, 1, 2, 3, 4 y 5 días. Para la realización del estudio se utilizó un citómetro de flujo (FACScalibur, Becton Dickinson, Madrid, Spain) con un láser de Argón a 488 nm de excitación y filtros de emisión apropiados para la fluoresceína.

3.2.1.9 CARACTERIZACIÓN CELULAR

La caracterización celular se realizó sobre células procedentes del primer subcultivo con los anticuerpos primarios que aparecen en la **tabla 13**. Una vez alcanzada la semiconfluencia en los frascos de cultivo, se eliminó el medio de cultivo y se lavó la superficie celular con 2 mL de HBSS 1X. Se realizó la disgregación celular y separación del sustrato mediante la incubación con tripsina-EDTA 1X durante 5 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se añadieron 3 mL de medio AmnioMAX para inactivar la acción de la tripsina. La suspensión celular se centrifugó durante 10 minutos a 1050 rpm y el pellet se resuspendió en 2 mL de AmnioMAX.

Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro colocados en placas multipocillo de 24 pocillos. Una vez alcanzada la semiconfluencia, las células fueron fijadas en líquido de Bouin, paraformaldehído al 4% en PBS, o en metanol a -20 °C, dependiendo del anticuerpo a utilizar y de la técnica a la que fueran a someterse las muestras.

El recuento de las células positivas para cada anticuerpo se realizó sobre 40 campos elegidos al azar (400x) y se expresó como el porcentaje de células marcadas con respecto al número de células totales. Los resultados fueron sometidos al test estadístico U de Mann Whitney con ayuda del programa GraphPad Prism 4 para Windows XP. La significación se estableció en $p < 0,05$.

a) Inmunohistoquímica (peroxidasa)

Los ensayos inmunohistoquímicos sobre las células mediante el método de la peroxidasa se realizaron según el protocolo descrito en el primer objetivo para las secciones de tejido.

b) Inmunofluorescencia sencilla

- Una vez fijadas las muestras, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS (pH=7,4).

- Bloqueo de las zonas de unión inespecíficas con BSA (albúmina sérica bovina) al 4% en PBS (pH=7,4), durante 45 minutos a temperatura ambiente. Cuando el antígeno contra el que actúa el anticuerpo primario a utilizar era intranuclear (ej: factores de transcripción como el Oct-3/4 o el Nanog) se añadió 0.1 Tritón X-100 al tampón de bloqueo.
- Retirado del tampón de bloqueo e incubación con el anticuerpo primario (según especificaciones de la casa comercial) diluido en BSA 4% en PBS durante una hora a 37°C.
- Se realizaron 3 lavados de 5 minutos en PBS 1X.
- Incubación con el anticuerpo secundario unido a FITC o Rodamina durante 1 hora a 37°C y en oscuridad.
- Se realizaron 3 lavados de 5 minutos en PBS 1X.
- Contraste de los núcleos celulares con DAPI.
- Se realizaron 3 lavados de 5 minutos en PBS 1X.
- Montaje de las muestras con el medio de montaje FluorSave™ Reagent (Calbiochem, USA).

Las secciones fueron examinadas con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) o con un microscopio confocal espectral (Leica TCS-SP5 RS AOBS).

c) Inmunofluorescencia doble

- Una vez fijadas las muestras, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS (pH=7,4).
- Bloqueo de las zonas de unión inespecíficas con BSA (albúmina sérica bovina) al 4% en PBS (pH=7,4), durante 45 minutos a temperatura ambiente.
- Retirada del tampón de bloqueo e incubación con el anticuerpo primario (según especificaciones de la casa comercial) diluido en tampón de bloqueo durante 30 minutos a 37°C.
- Se realizaron 3 lavados de 5 minutos en PBS 1X.
- Incubación con el anticuerpo secundario unido a FITC durante 30 minutos a 37°C y en oscuridad. A partir de este momento todo el proceso se realizó en oscuridad.

- Se realizaron 3 lavados de 5 minutos en PBS 1X. Se almacenaron las muestras a 4°C durante toda la noche inmersas en PBS 1X.
- El día siguiente se realizó el bloqueo de las zonas de unión inespecíficas de nuevo con BSA (albúmina sérica bovina) al 4% en PBS (pH=7,4), durante 45 minutos a temperatura ambiente. Cuando el antígeno con el que reaccionaba el anticuerpo primario a utilizar era intranuclear (factores de transcripción como el Oct-3/4 y el Nanog) se añadió 0.1 Tritón X-100 al tampón de bloqueo.
- Retirada del tampón de bloqueo e incubación con el segundo anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo durante 30 minutos a 37°C
- Se realizaron 3 lavados de 5 minutos en PBS 1X.
- Incubación con el anticuerpo secundario unido a Rodamina durante 30 minutos a 37°C.
- Se realizaron 3 lavados de 5 minutos en PBS 1X
- Contraste de los núcleos celulares con DAPI.
- Se realizaron 3 lavados de 5 minutos en PBS 1X.
- Montaje de las muestras con el medio de montaje FluorSave™ Reagent (Calbiochem, USA).

Las secciones fueron examinadas con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) o con un microscopio confocal (Leica TCS-SP5).

Anticuerpo	Especificidad	Clon	Dilución	Proveedor
α -actina de músculo liso	Células de músculo liso	1A4	1:400	SIGMA
Vimentina	Células mesenquimales	V9	1:40	SIGMA
Podocalixina	Hemangioblastos, precursores comunes de las células endoteliales y hematopoyéticas	222328	1:10	R&D Systems
CD9	Plaquetas, células B tempranas, eosinófilos, basófilos y células T activadas. Células mesenquimales	209306	1:10	R&D Systems
E-caderina	Células mesoteliales	180224	1:10	R&D Systems
Oct-3/4	Factor de transcripción que mantiene la pluripotencialidad de las células madre	–	1:10	R&D Systems
SSEA-4	Células madre pluripotentes	MC-813-70	1:10	R&D Systems
Citoqueratina basal	Reconoce la citoqueratina 5. Marca células epiteliales basales y la población de células madre del epitelio de próstata	RCK103	1:25	Abcam
Citoqueratina 18	Células mesoteliales	RGE53	1:50	Abcam
PECAM-1 (CD31)	Marcador específico de endotelio	WM-59	1:100	SIGMA
Desmina	Células musculares	DE-U-10	1:50	SIGMA
Miosina	Células musculares	HSM-V	1:150	SIGMA

Tabla 13: Anticuerpos primarios empleados en los ensayos de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.

3.2.1.10 WESTERN BLOTTING

3.2.1.10.1 Extracción de proteínas a partir de cultivos celulares

Una vez alcanzada la confluencia en frascos de 25 cm² que contenían células de omentum control o células procedentes de adherencias en el primer subcultivo, se procedió a la extracción de proteínas. Para ello se retiró el medio de cultivo en condiciones de esterilidad y se lavó 3 veces la capa de células con PBS 1X estéril. Posteriormente, se procedió a la lisis celular mediante incubación con el tampón de extracción durante 1 hora a 4° C.

Composición del tampón de extracción:

- 3.2% (v/v) de Na₂HPO₄ 0.5 M
- 75% (v/v) de Urea 8M
- 5% (v/v) de NP-40 al 10%
- 2.5% (v/v) de EDTA 0.2 M
- 10.3% (v/v) de agua bidestilada
- 4% de inhibidores de proteasas X25

Para la preparación de los inhibidores de proteasas X25 se disolvió 1 pastilla de EDTA-Free Protease Inhibitor cocktail tablets (Roche Applied Science, USA) en 2 mL de agua bidestilada.

Una vez realizada la extracción, se procedió al raspado del lisado celular con un raspador celular para asegurarnos de que se había producido la lisis completa de todas las células. Este lisado se recogió en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se agitó con el vortex. Se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos a 4° C. y se recogió el sobrenadante, que contenía las proteínas intracelulares, para llevarlo a un eppendorf limpio para almacenarlo a -80° C hasta el momento de su utilización.

3.2.1.10.2 Determinación de la concentración proteica y Western blot

Ambos procesos se realizaron tal y como se describió en el primer objetivo. Los anticuerpos empleados para la inmunodetección son los que se detallan en la tabla siguiente:

Anticuerpo	Especificidad	Clon	Dilución	Proveedor
Podocalixina	Hemangioblastos, precursores comunes de las células endoteliales y hematopoyéticas	222328	1:10	R&D Systems
Desmina	Músculo liso, cardíaco y esquelético	DE-U-10	1:50	SIGMA
α -actina de músculo liso	Células musculares lisas, marcador de diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos	1A4	1:400	SIGMA
β -actina	Utilizado como control de carga para la normalización de las bandas	JLA-20	1:2000	Calbiochem

Tabla 14: Anticuerpos primarios utilizados en la técnica Western blot.

3.2.2 RESULTADOS

3.2.2.1 ESTUDIOS MORFOLÓGICOS

El proceso de expansión celular, caracterizado por la migración celular y la colonización de la superficie de cultivo, se observó a partir de las 12-24 horas posteriores a la colocación de los explantos de tejido adherencial en el frasco de cultivo (**figura 45**). En los momentos iniciales, tras abandonar el explanto, las células presentaban un aspecto pleomórfico, en su mayoría con apariencia elongada, poniendo de manifiesto el carácter migratorio de las células en esos momentos (**figura 45**).

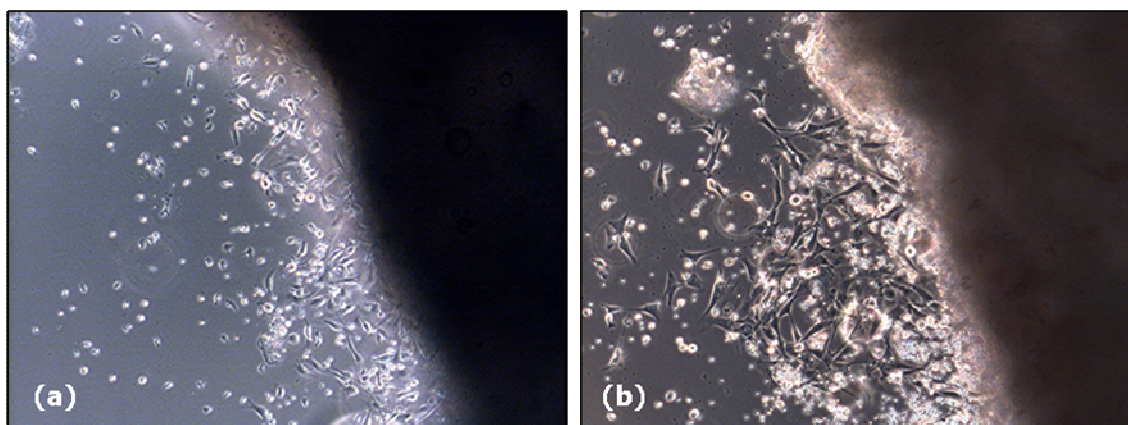


Figura 45: Salida y expansión de las células a partir del explanto del tejido adherencial (100x) (a) a las 12 horas tras la colocación del explanto y (b) a los 2 días.

Una vez que el cultivo estaba próximo a la confluencia, las células mostraban una morfología típicamente mesotelial, similar a la encontrada en los cultivos control de células mesoteliales procedentes de omentum. Ambos cultivos se disponían en monocapa con apariencia de empedrado, característica de las células mesoteliales (**figura 46**). Observamos que las células que formaban la monocapa presentaban una morfología poligonal con núcleos redondeados y bastante centrados que se caracterizaban por la presencia de uno, dos o tres nucleolos bien definidos, indicador del alto grado proliferativo de esta estirpe celular. Estas células mostraban un abundante glicocalix, característica también típica de células mesoteliales.

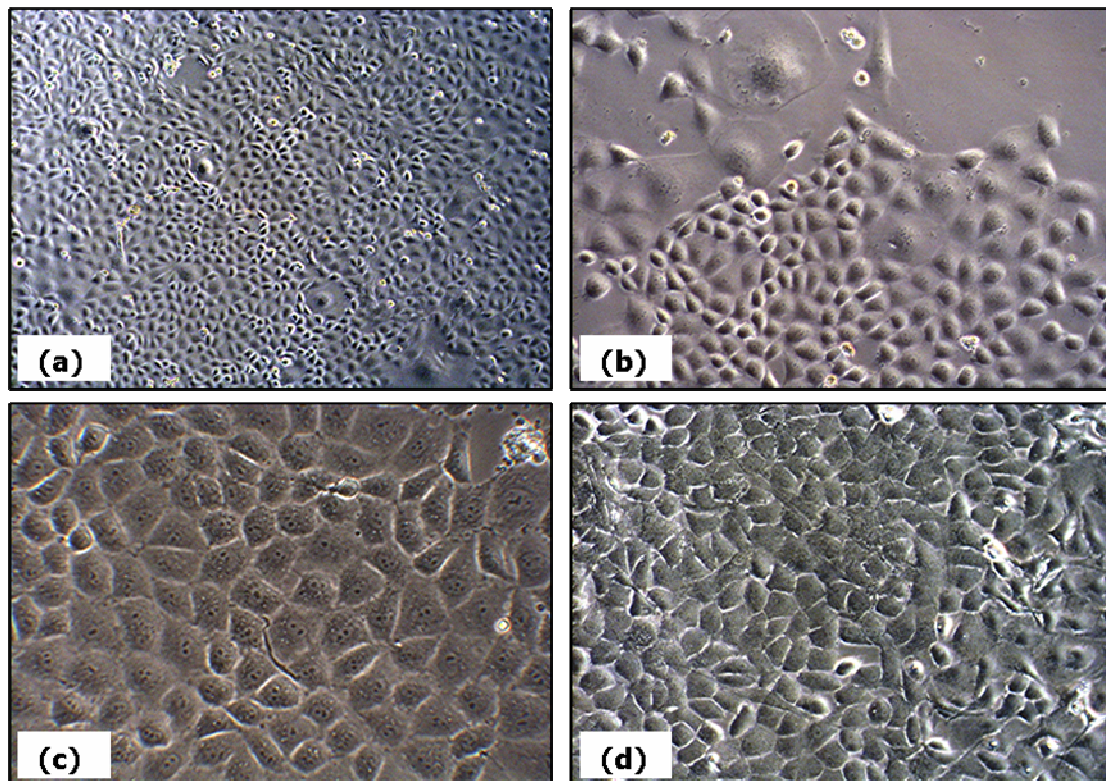


Figura 46: Aspecto de las células obtenidas a partir del tejido adherencial en el primer subcultivo (a) 100x; (b) 200x; (c) 400x. Obsérvese la similitud en cuanto a la morfología en cultivo con las células obtenidas mediante digestión enzimática a partir del omentum en (d) 200x).

A lo largo de los subcultivos se perdía la capacidad de disposición en monocapa a medida que empezaban a aparecer colonias de morfología fibroblastoide que proliferaban para colonizar grandes áreas, limitando y encapsulando a las células con morfología mesotelial que cada vez eran más minoritarias. A partir del quinto-sexto subcultivo, la mayoría de las poblaciones celulares presentaban morfología fibroblástica o de tipo mesenquimal (**figura 47**), ya fuera debido a un cambio de la morfología de las células mesoteliales que conformaban la monocapa como consecuencia de las condiciones de cultivo, o a un aumento en el número de células de aspecto fibroblastoide debido a su mayor índice proliferativo. A partir de este momento, los cultivos mantenían una morfología fusiforme con un núcleo ovalado y que se disponía a lo largo del eje mayor de las células, recordando al aspecto de un cultivo de células mesenquimales (**figura 48**).

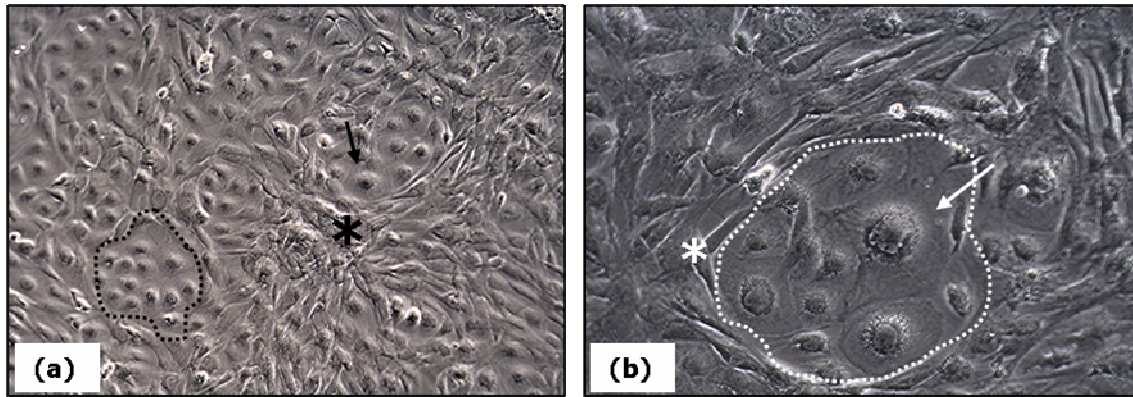


Figura 47: Células procedentes de adherencias en el sexto subcultivo. (a) 100x y (b) 200x. Se observaban células de morfología poligonal correspondientes a células mesoteliales (→) rodeadas (---) por células de aspecto fibroblastoide (*), probablemente correspondientes a células de naturaleza mesenquimal.

Las células obtenidas a partir del tejido adherencial y cultivadas en medio de cultivo AmnioMax eran capaces de autorrenovarse y permanecer en cultivo durante largos períodos de tiempo (**figura 49**), llegando a sobrepasar los 200 subcultivos y manteniendo durante todo este tiempo su ritmo proliferativo en cultivo, de manera que triplicaban su población en unos 3-4 días.

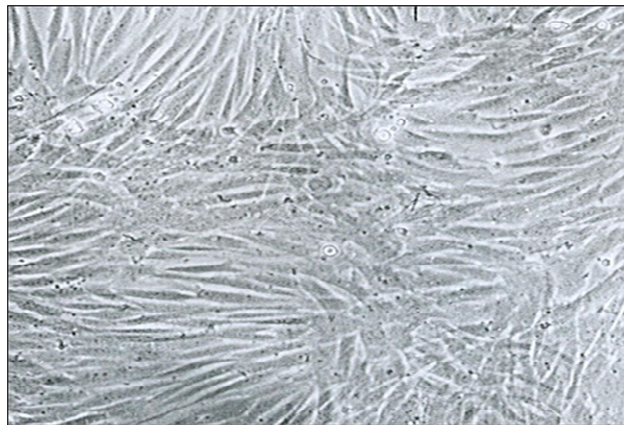


Figura 48: Células procedentes de tejido adherencial en el subcultivo 125. Obsérvese la morfología fibroblástica o mesenquimal y el crecimiento en multicapa de esta estirpe celular.

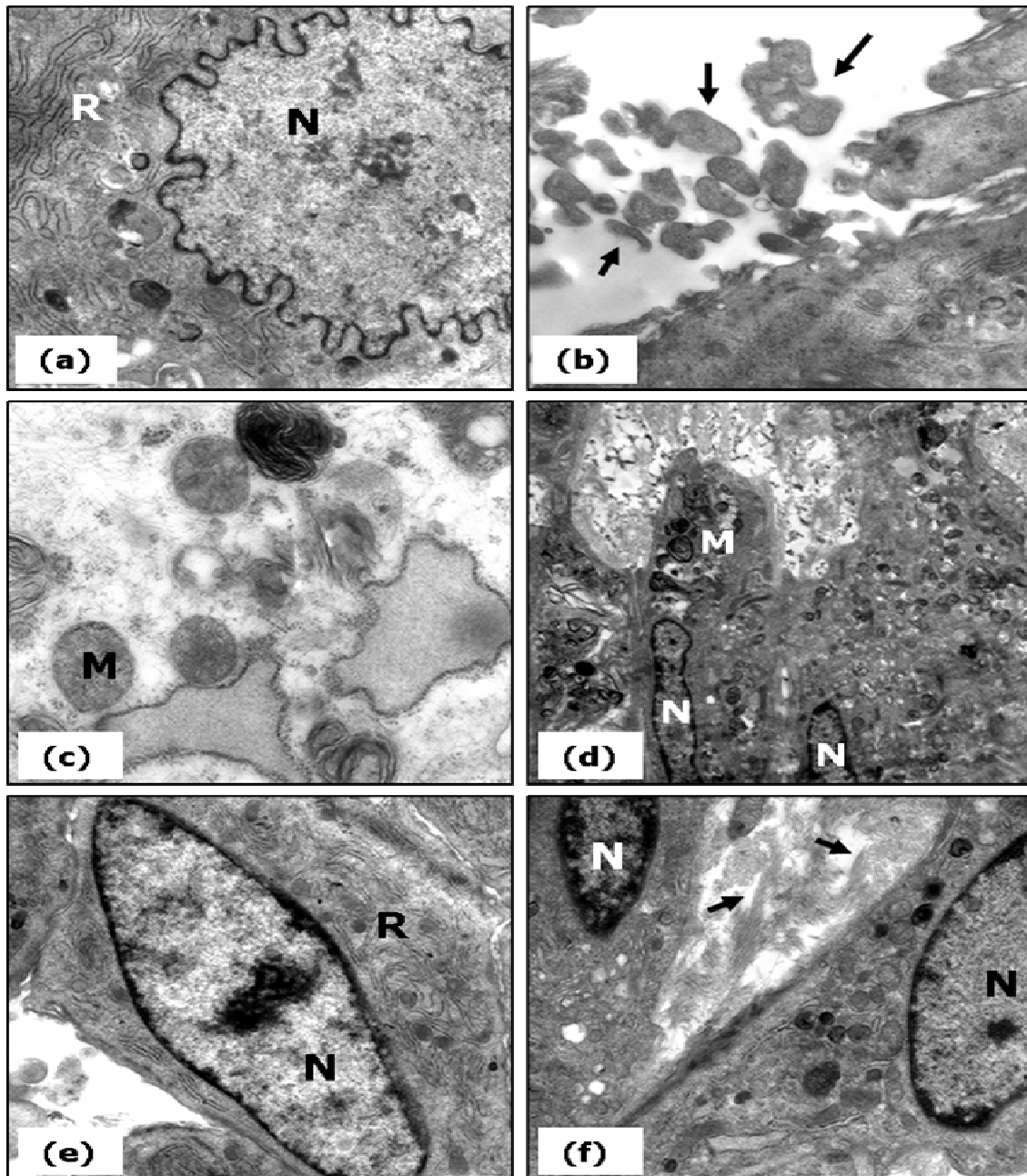


Figura 49: Ultraestructura de las células extraídas a partir de tejido adherencial de 7 días en los subcultivos 48 (a, b y c) y 102 (d, e y f). En el subcultivo 48, se observaban células con un retículo bien desarrollado. Nótese el grado de contracción del núcleo (a, 8000x) y fragmentos citoplásmicos en secciones transversales (→) (b, 6300x). Se observó una elevada dilatación del retículo rugoso y mitocondrias en el citoplasma celular (c, 20000x). En el subcultivo 102, zonas de degeneración celular (d, 3150x) alternaban con células secretoras en buen estado (e, 5000x; f, 6300x). Obsérvese la elevada secreción de componentes de la MEC (colágeno) al medio extracelular (f, →). N, núcleo celular; R, retículo endoplasmático; M, mitocondria.

3.2.2.2 ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR

El método de exclusión del azul tripán reveló una capacidad proliferativa (cantidad de células viables) significativamente superior de las células procedentes de adherencias con respecto a la población celular control (**figura 50**). La diferencia no era tan evidente cuando se comparaban los dos tipos de adherencias (fibrosas y adiposas). Transcurridas 48 horas en cultivo, el número de células de adherencias viables era entre 3 y 6 veces superior al número de células mesoteliales viables. Las células procedentes de adherencias fibrosas mostraban una tasa de proliferación superior hasta el tercer día de cultivo ($p<0.05$), momento a partir del cual la tasa de crecimiento disminuía ligeramente. Por el contrario, en el octavo día de cultivo se observaba un aumento considerable en el número de células proliferantes procedentes de adherencias adiposas con respecto a las células de adherencias fibrosas ($p<0.01$).

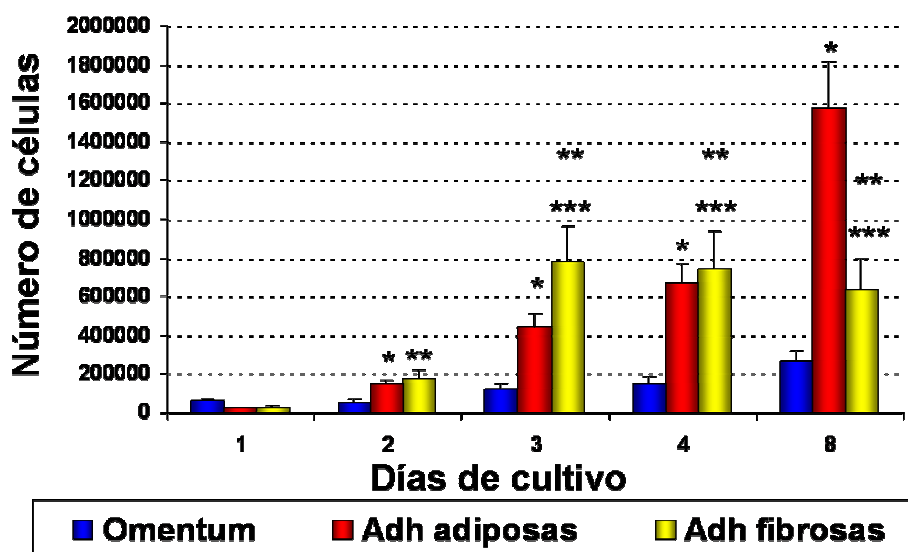


Figura 50: Ensayo de proliferación celular. Se representa el número de células viables para los distintos tiempos de estudio. Obsérvese el incremento en el número de células viables procedentes de adherencias con respecto a las células procedentes de omentum libre de adherencias

*diferencias estadísticamente significativas entre las células del omentum y las células procedentes de adherencias adiposas ($p<0.05$)

**diferencias estadísticamente significativas entre las células de omentum y las células procedentes de adherencias fibrosas ($p<0.05$)

*** diferencias estadísticamente significativas entre células procedentes de ambos tipos de tejido ($p<0.05$).

Los resultados encontrados mediante citometría de flujo (**figura 51**) confirmaban las diferencias en las tasas de proliferación encontradas entre las células de las adherencias y las del omentum mediante el método de exclusión del azul tripán. Dado que las células muestran una disminución en la intensidad de fluorescencia a medida que se producen las divisiones celulares, nuestros resultados indicaban que, tras dos días en cultivo, la población celular procedente de tejido adherencial había sufrido una media de tres divisiones celulares y, que transcurridos los cinco días de estudio, las células se habían dividido una media de 6 veces. En cuanto a las células procedentes de omentum, al finalizar el período de estudio no se había producido de media una división celular de toda la población.

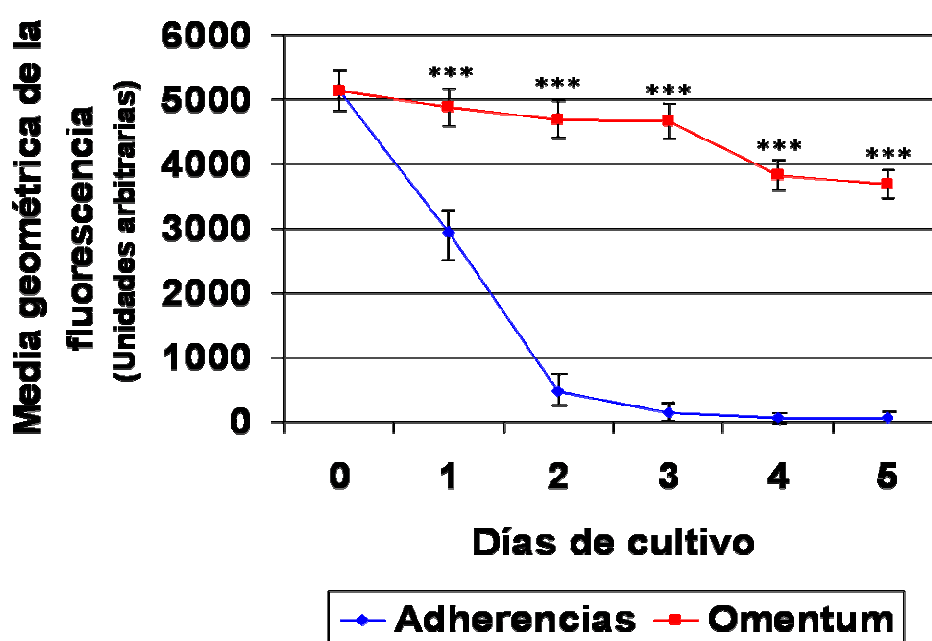


Figura 51: Ensayo de proliferación celular mediante citometría de flujo usando el trazador CFSE (carboxyfluorescein diacetate). Se representa la media geométrica de la fluorescencia para cada uno de los tiempos de estudio en células procedentes de adherencias y células omentales (***) $p < 0.001$).

3.2.2.3 ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS Y DE INMUNOFLUORESCENCIA

Se realizó el ensayo de inmunofluorescencia para la citoqueratina 18 en células procedentes del omentum cultivadas en M199+EGF, con la finalidad de conocer la capacidad de esta población para diferenciarse a células mesoteliales maduras. Se obtuvo un 38,91% de células positivas en el cuarto subcultivo (**figura 52**).

La caracterización celular se llevó a cabo en células del primer subcultivo que habían sido mantenidas en medio de cultivo AmnioMAX, con el fin de que mantuvieran *in vitro* el fenotipo que presentaban *in vivo*.

Todas las células procedentes del omentum expresaron el marcador de superficie podocalixina, característico de hemangioblastos (**figura 53**). Esto explicaría la elevada capacidad vasculogénica de esta población celular, dado su potencial hematopoyético y endotelial. La naturaleza epitelial de estas células fue revelada por su expresión de E-caderina y citoqueratina-5, mientras que sólo el 3% de la población era positiva para la citoqueratina-18 (citoqueratina madura). Alrededor del 10% de la población expresaba el antígeno CD9, característico de células madre mesenquimales, las células B, plaquetas y células endoteliales microvasculares. Sin embargo, la mayoría de las células de esta población no expresaba el marcador endotelial específico CD31 (**tabla 15**).

La expresión de vimentina mostraba la eficiencia de adhesión al sustrato (**figura 57**), mientras que la ausencia de marcadores como la miosina y la desmina las alejaba de la línea muscular.

El fenotipo celular mostrado por las células procedentes del tejido adherencial difería según la morfología encontrada histológicamente para ese tejido (**tabla 15**).

Las células derivadas de las adherencias de tipo fibroso mostraban un fenotipo claramente miofibroblástico (100% positivas para α -actina de músculo liso y negativas para desmina, miosina y CD9) (**tabla 15, figura 54**). Se observaba una gran reducción en la proporción de células positivas para E-caderina y SSEA-4 con respecto a las células mesoteliales control. Ninguna de las poblaciones procedentes de tejido adherencial (fibroso o adiposo) mostraron podocalixina, aunque sí mostraron positividad para CD31, probablemente en aquellas células procedentes de los microvasos observados en tejido (**figura 54, tabla 15**).

En las poblaciones obtenidas a partir de adherencias de tipo principalmente adiposo, se encontró que un 21% de las células era positivo para marcadores mesenquimales comprometidos hacia la línea muscular-vascular (CD9 y desmina) y el 68% era positivo para el marcador de músculo liso miosina (**figura 55, tabla 15**). Estos hallazgos, junto con la proporción de células positivas para CD31 (22.6%) (**figura 58, tabla 15**), concuerdan con el tejido conectivo altamente vascularizado encontrado histológicamente en las adherencias adiposas. La proporción de células positivas para la E-caderina (46%) era intermedia entre la observada para las células control del omentum y las adherencias de tipo fibroso (**figura 56**).

Prácticamente todas las células del omentum expresaron SSEA-4 (**figuras 53 y 59**), característica de células madre pluripotentes o células embrionarias. Aunque este marcador fue expresado en menores proporciones en las células derivadas de las adherencias, la diferencia no resultó estadísticamente significativa (**tabla 15**). El factor de transcripción Oct-3/4 requerido para el mantenimiento de la pluripotencialidad y la capacidad de autorrenovación de las células madre o células indiferenciadas apareció en un 90-100% de todas las poblaciones celulares analizadas (**tabla 15**).

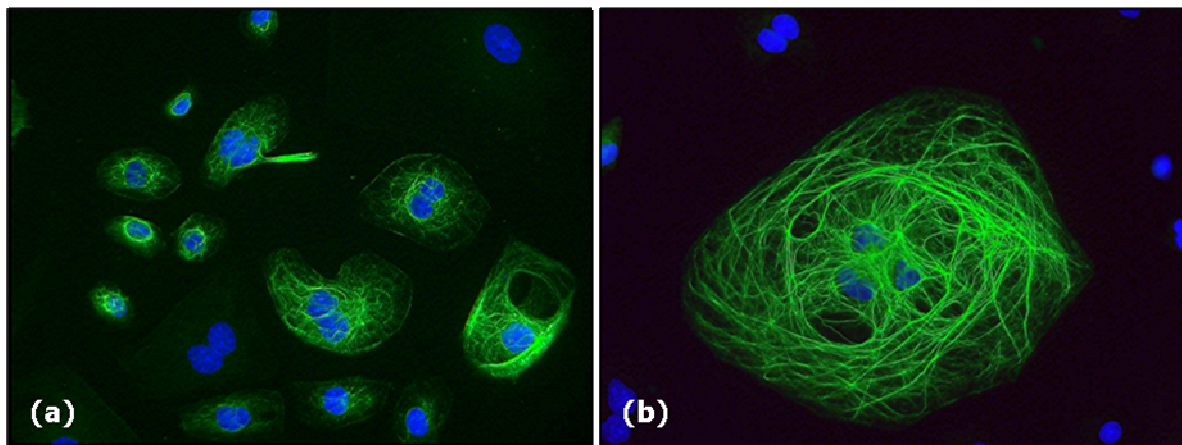


Figura 52: Células del cuarto subcultivo procedentes del omentum, cultivadas en M199 + EGF, positivas para la citoqueratina 18 (400x)

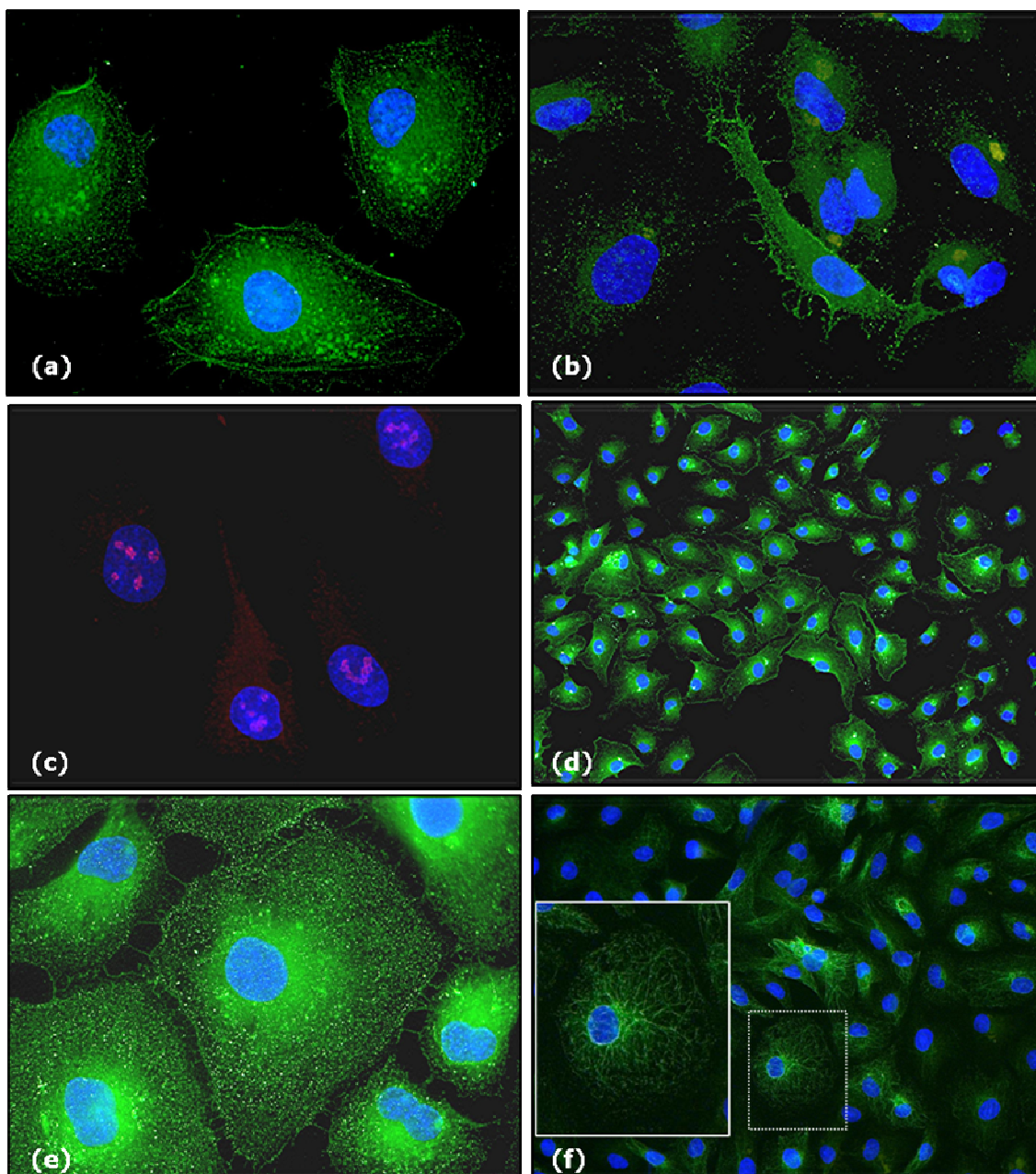


Figura 53: Expresión de diferentes marcadores en células procedentes del omentum en primer subcultivo: (a) Podocalixina, 1000x; (b) CD9, 1000x; (c) Oct-3/4, 1000x; (d) SSEA-4, 200x; (e) SSEA-4, 1000x; (f) Citoqueratina-5, 400x.

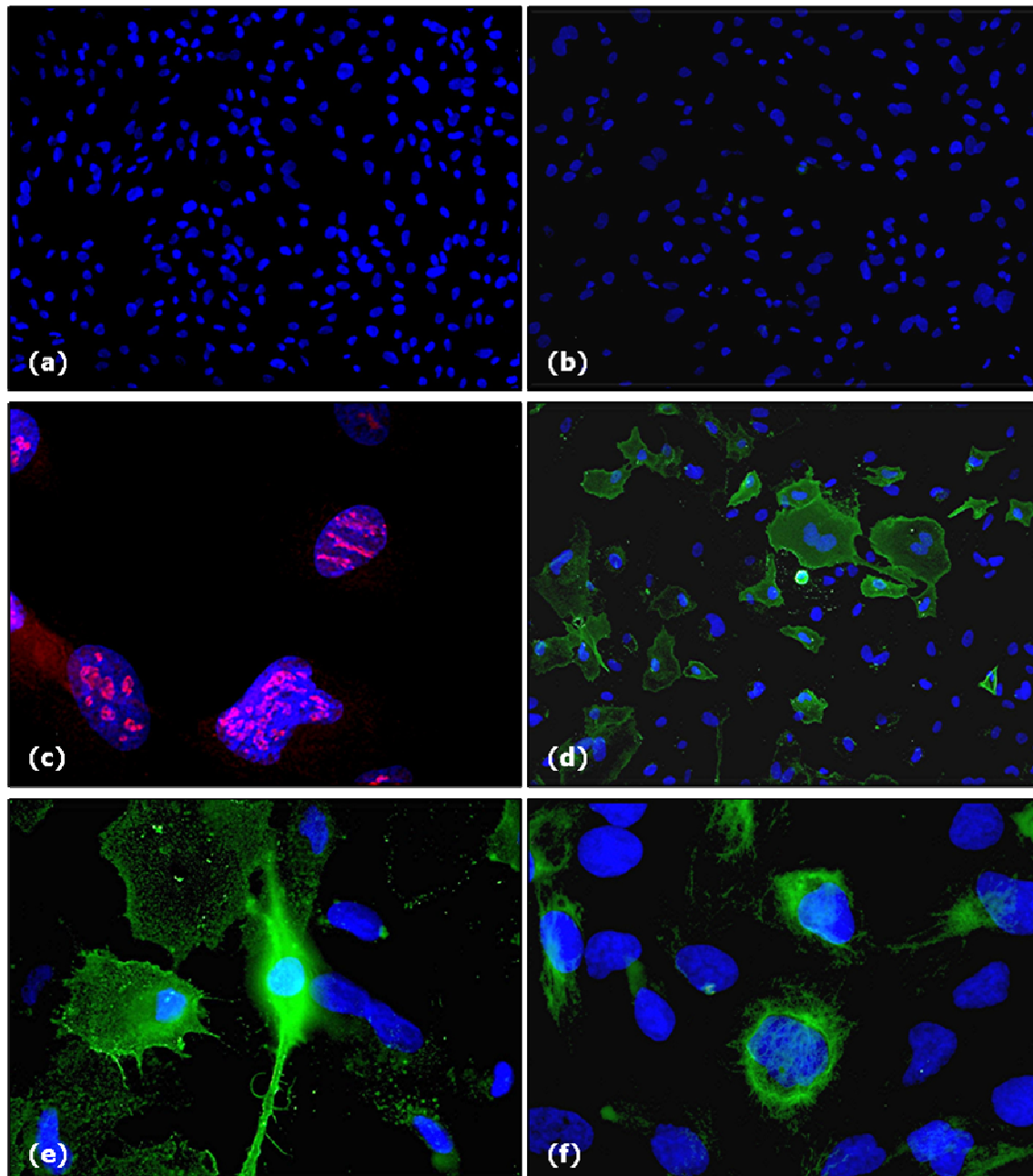


Figura 54: Expresión de diferentes marcadores en células procedentes de adherencias de tipo fibroso en primer subcultivo: (a) Podocalixina, 200x; (b) CD9, 200x; (c) Oct-3/4, 1000x; (d) SSEA-4, 200x; (e) SSEA-4, 1000x; (f) Citoqueratina-5, 1000x

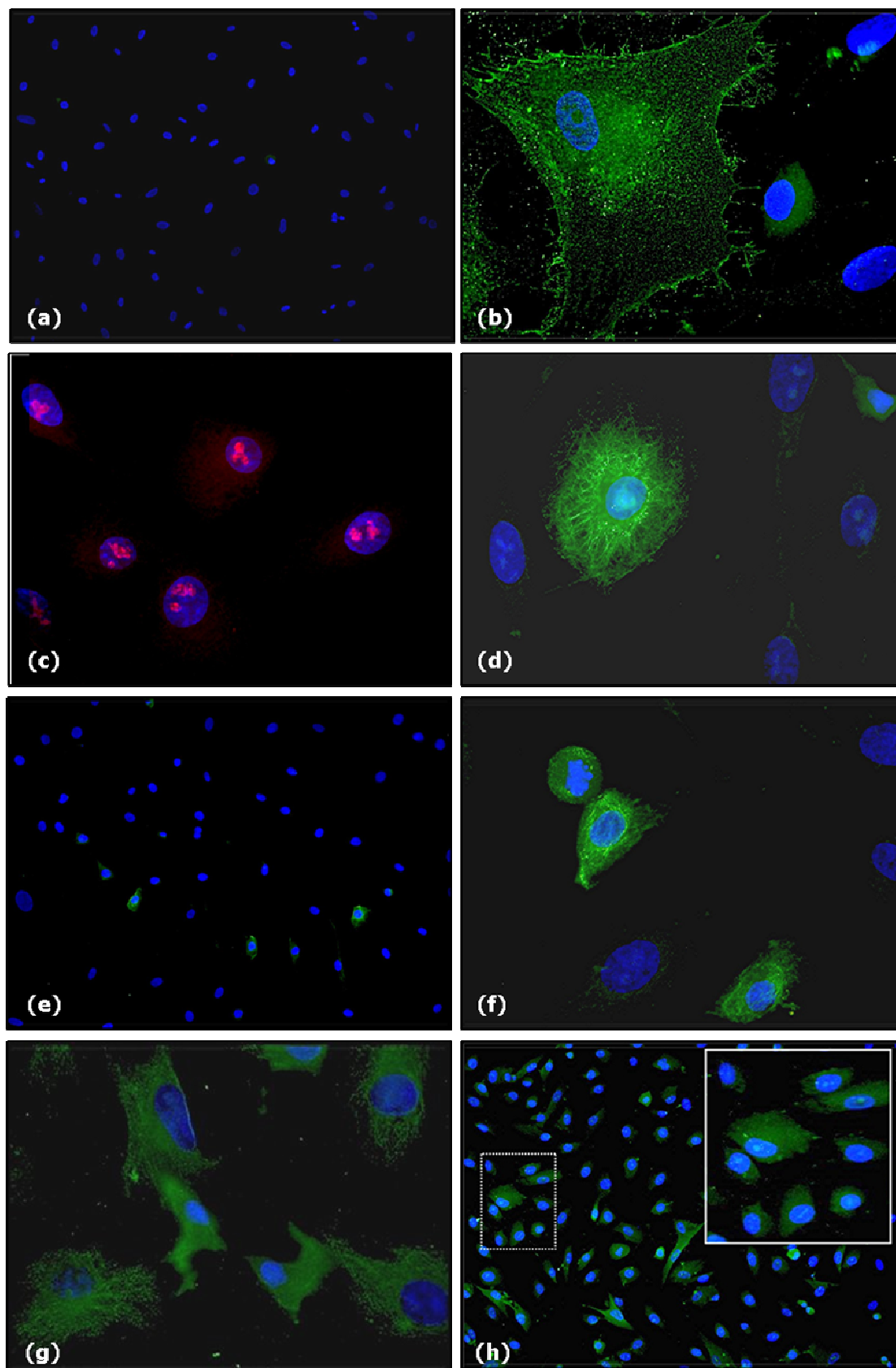


Figura 55: Expresión de diferentes marcadores en células procedentes de adherencias de tipo adiposo: (a) Podocalixina, 200x; (b) CD9, 1000x; (c) Oct-3/4, 1000x; (d) Citoqueratina-5, 1000x; (e) Citoqueratina-18, 200x; (f) Citoqueratina-18, 1000x; (g) Desmina, 1000x; (h) Miosina, 200x.

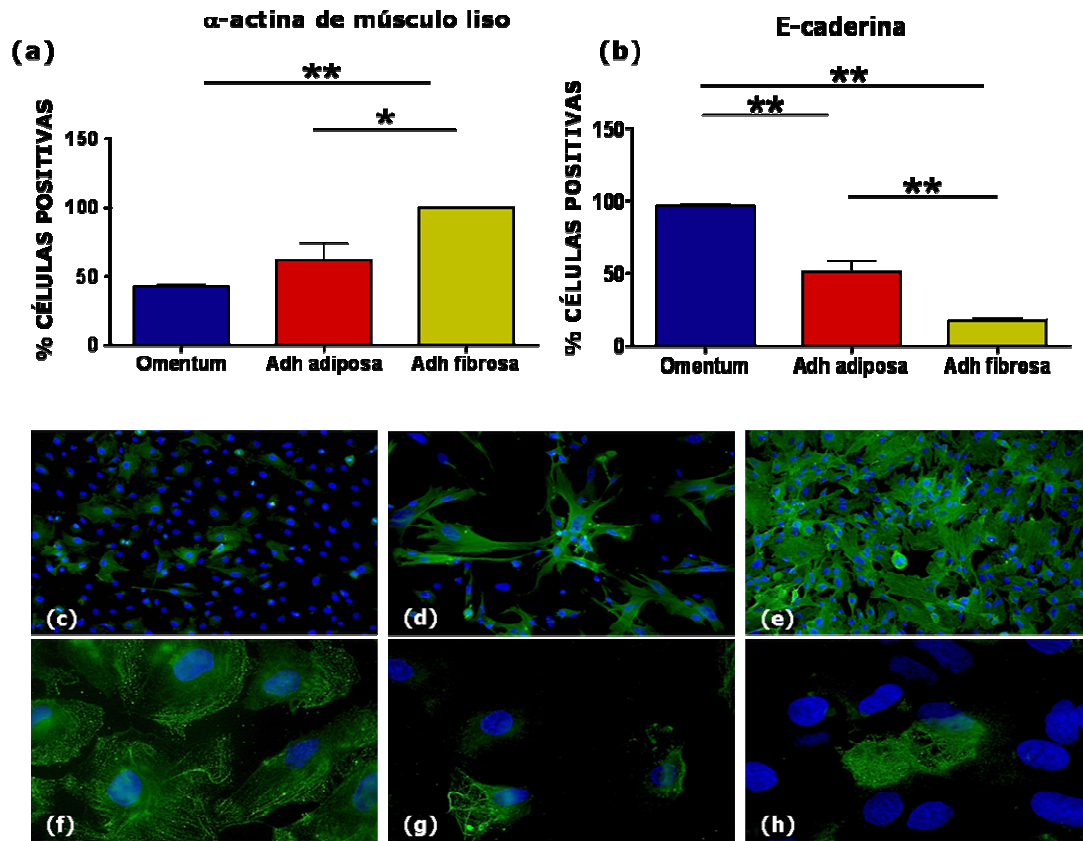


Figura 56: Transición de fenotipo epitelial a mesenquimal cuando las células del omentum participan en la formación de una adherencia. Porcentaje de células que expresaron (a) α -sma y (b) E-caderina (media \pm SD) en células del primer subcultivo para cada grupo de estudio (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). Expresión de los marcadores α -sma (c, d y e; 200x) y E-caderina (f, g y h, 1000x) de las células procedentes del omentum (c y f), de las células de adherencias adiposas (d y g) y de células de adherencias fibrosas (e y h).

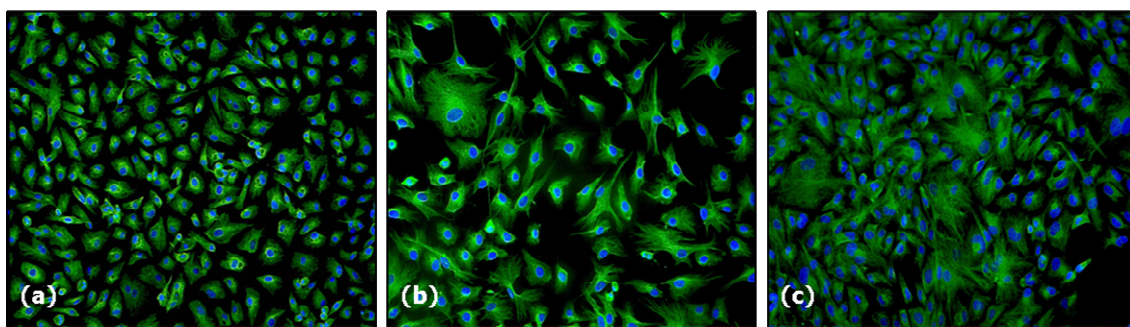


Figura 57: La expresión del marcador vimentina ponía de manifiesto la naturaleza adherente de las tres poblaciones celulares estudiadas: (a) Células procedentes del omentum (200x); (b) Células procedentes de adherencias de tipo adiposo (200x); (c) Células procedentes de adherencias de tipo fibroso (200x).

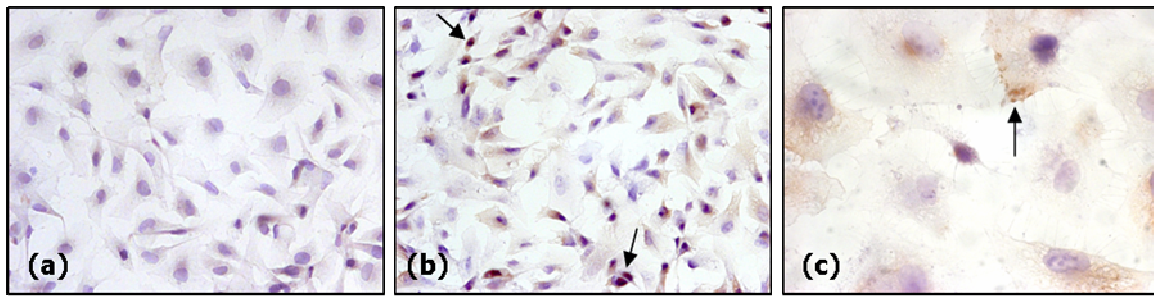


Figura 58: Expresión para el marcador específico endotelial PECAM-1 (CD31) en (a) células del omentum (400x); (b) Células de adherencias de tipo adiposo (→) (400x); (c) Detalle de la presencia de positividad para CD31 (→) en células de adherencias de tipo adiposo (1000x).

Anticuerpo	Células del omentum	Células de adherencia adiposa	Células de adherencia fibrosa
Oct-3/4	100%	91±5.1%	100%
SSEA-4	96.2±1.8% (*) (†)	53±13.1%	67.1±14.0%
Podocalixina	100% (*) (†)	0%	0%
CD9	10.8±5.6% (*) (†)	21±7.9% (‡)	0%
E-caderina	94±4.7% (*) (†)	46±21.7% (‡)	17.5±2.7%
CK5	83.6±14.4% (*) (†)	3.5±0.3% (‡)	29.7±7.8%
CK18	3.0±0.2% (*) (†)	11±1.6% (‡)	0%
Vimentina	100%	100%	100%
α -sma	43.3±5.9% (†)	53±3.4% (‡)	100%
Desmina	0%	21±2.3%	0%
Miosina	0% (*)	68±7.3% (‡)	0%
PECAM-1 (CD31)	0.6±0.5%	22.6±1.3%	19.6±0.2%

Tabla 15: Porcentaje de células positivas para cada uno de los marcadores utilizados en células procedentes del primer subcultivo. Los valores vienen indicados como la media \pm desviación estándar

* diferencias estadísticamente significativas entre las células de omentum y las de adherencias adiposas ($p < 0.05$)

† diferencias estadísticamente significativas entre las células de omentum y las de adherencias fibrosas ($p < 0.05$)

‡ diferencias estadísticamente significativas entre las células procedentes de ambos tipos de adherencias ($p < 0.05$).

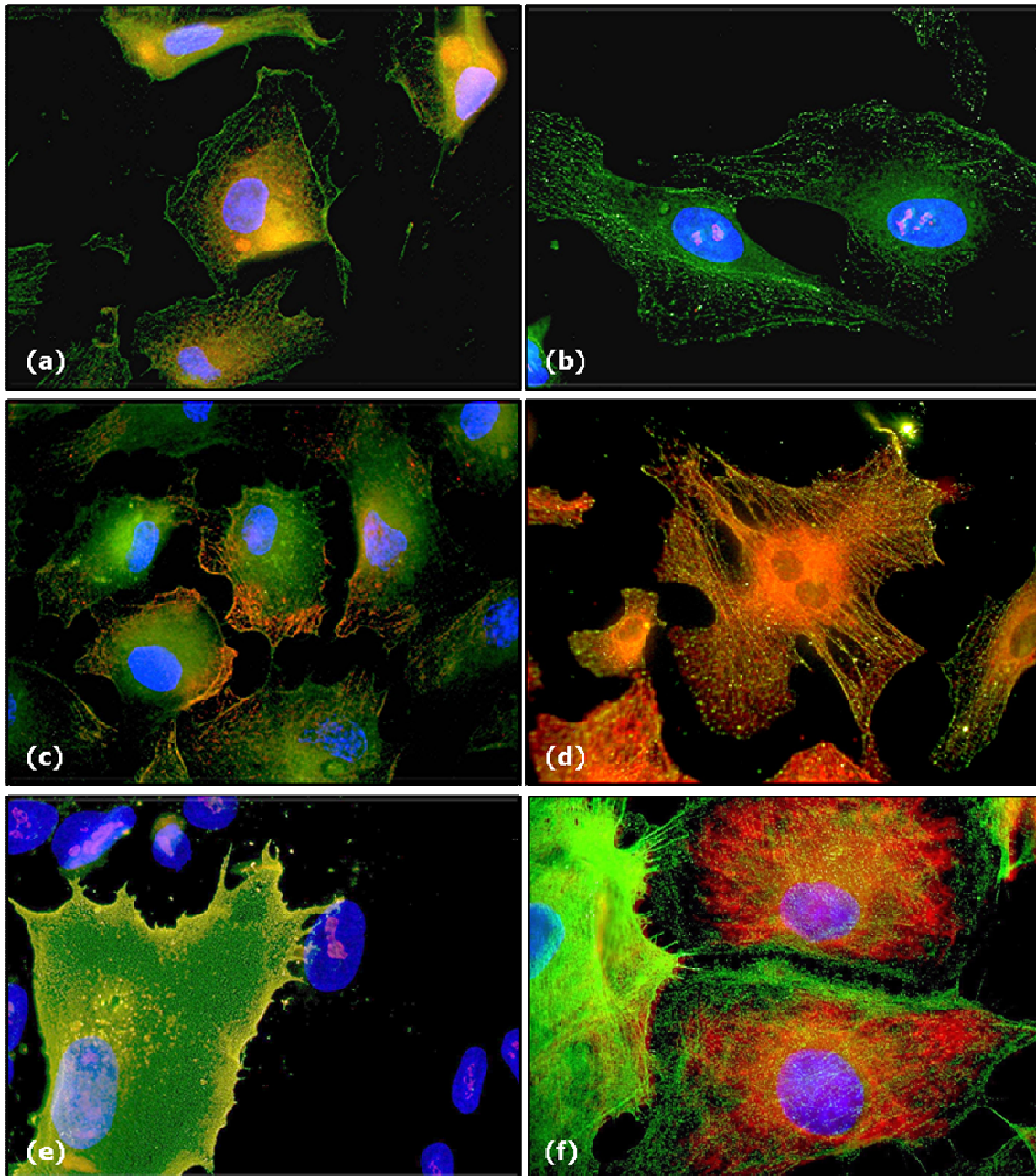


Figura 59: Ensayo de inmunofluorescencia doble para diferentes marcadores. (a) Células de omentum. CD9 (verde)+SSEA-4 (rojo) (1000x); (b) Células del omentum. E-caderina (verde)+Oct-3/4 (rojo) (1000x); (c) Células del omentum. CD9 (verde)+E-caderina (rojo) (1000x); (d) Células de omentum. E-caderina (verde)+SSEA-4 (rojo) (630x); (e) Células de adherencia fibrosa. SSEA-4 (verde)+ Oct-3/4 (rojo) (1000x); (f) Células de adherencia fibrosa. Vimentina (rojo)+ α -actina de músculo liso (verde) (1000x).

3.2.2.4 WESTERN BLOT

Se determinaron los siguientes marcadores en las 3 poblaciones celulares: podocalixina, desmina y α -actina de músculo liso.

La podocalixina es una proteína de ~140 kDa que es expresada en los podocitos del riñón así como en la superficie del endotelio vascular, células mesoteliales, megacariocitos y progenitores hematopoyéticos. Para las células derivadas de omentum, se detectó una banda de 140 kDa cuya expresión fue significativamente superior a la mostrada por las células derivadas de adherencias, cuya expresión fue prácticamente nula (**figura 60**).

Los niveles de expresión de la desmina (50-55 kDa) fueron significativamente superiores ($p < 0.05$) para las adherencias adiposas en comparación con las células mesoteliales del omentum (**figura 60**).

En cuanto a la expresión de α -actina de músculo liso (42 kDa), en adherencias de tipo fibroso también se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) en comparación con las células del omentum y las células procedentes de adherencias de tipo adiposo (**figura 60**). Sin embargo, la diferencia en los niveles de expresión para este marcador en estas dos últimas poblaciones celulares no era significativa ($p > 0.05$).

En general, los resultados obtenidos mediante la técnica de Western blot confirmaban los resultados encontrados mediante los ensayos de inmunofluorescencia. La podocalixina parecía ser un marcador importante de las células mesoteliales de omentum, mientras que se encontraba ausente en las poblaciones celulares de adherencias. Las células procedentes de adherencias de tipo adiposo venían caracterizadas por su elevada expresión de desmina, mientras que en el caso de las adherencias fibrosas, la α -actina de músculo liso aparecía como el marcador diferenciador de esta población celular.

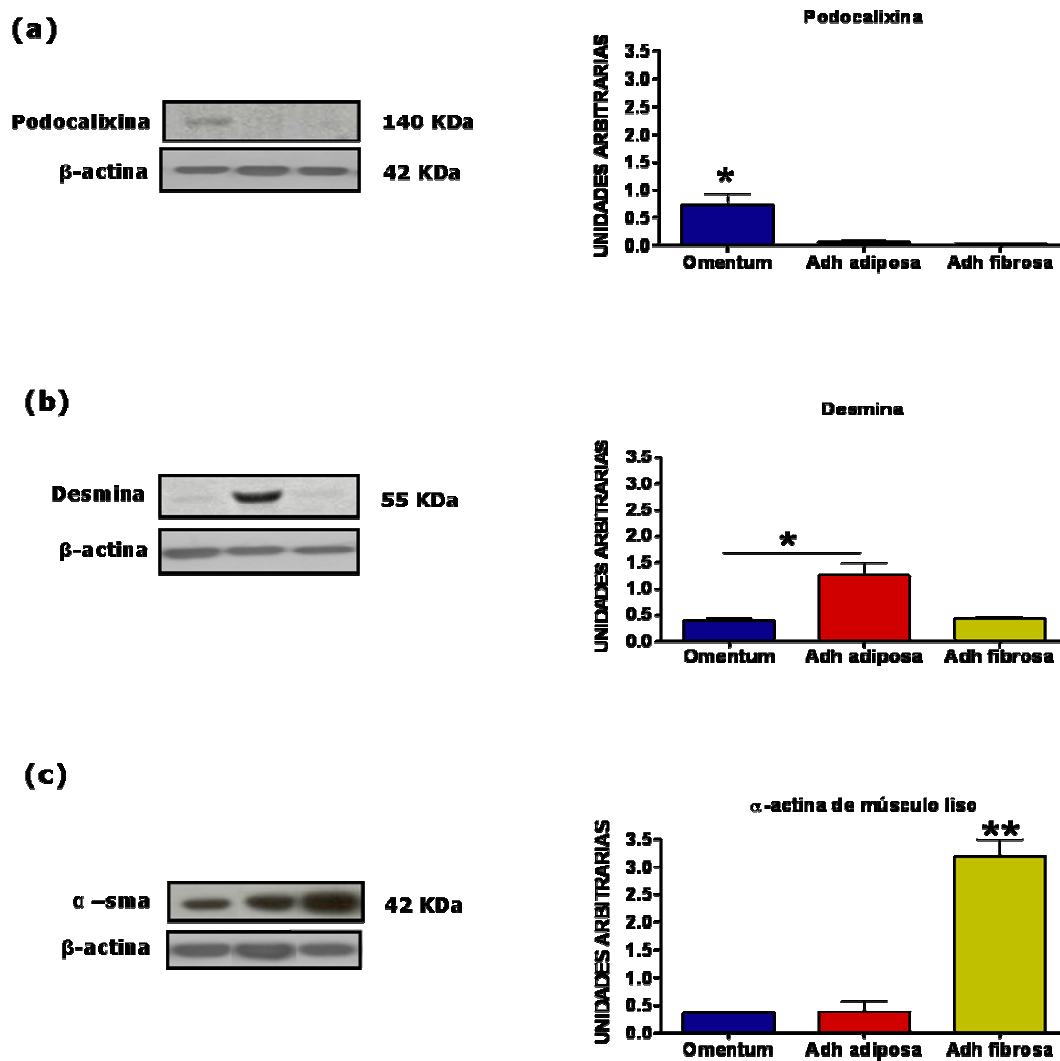


Figura 60: Resultados de Western blot para la (a) podocalixina, (b) la desmina y (c) la α-sma. Las gráficas muestran la media \pm desviación estándar (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) de los valores obtenidos mediante densitometría de las bandas de cada una de las poblaciones celulares estudiadas. Como control de carga se incubaron las membranas con el anticuerpo β-actina y la intensidad de sus bandas fue utilizada para normalizar los valores obtenidos para la podocalixina, la desmina y la α-sma. OC, células procedentes del omentum; Adh, adherencia.

3.2.3 CONCLUSIONES

De las tres poblaciones estudiadas (omentum control, adherencia adiposa y adherencia fibrosa), pudimos concluir que:

- 1) Las células de las adherencias activadas por la presencia de un biomaterial presentaban una tasa de proliferación significativamente superior a las células del omentum.
- 2) Las poblaciones celulares procedentes de adherencias adiposas y fibrosas mostraban un comportamiento proliferativo diferente. Las adherencias fibrosas alcanzaban la meseta a los 3 días mientras que las adiposas iniciaban una progresión más lenta pero de modo exponencial a lo largo del tiempo de estudio.
- 3) En este tiempo de estudio (7 días), las poblaciones celulares expandidas mostraban que el fenotipo se podía considerar establecido.

Así, era posible identificar marcadores específicos para cada una de las poblaciones, siendo la E-caderina, la citoqueratina 5 y la podocalixina altamente significativas en la población control. Las adherencias fibrosas se caracterizaban por un alto contenido en α -sma y ausencia de desmina y miosina; y la población obtenida a partir de adherencias adiposas mostraba un perfil fenotípico intermedio entre ambas poblaciones, con presencia de marcadores musculares y de célula mesenquimal.

De la valoración de estos resultados y de los obtenidos en el objetivo 1, podemos afirmar que el omentum y las adherencias fibrosas constituían tejidos con un perfil de diferenciación establecido, mientras que las adherencias adiposas mostraban una población mesenquimal en vías de diferenciación.

3.3 TERCER OBJETIVO

Partiendo del conocimiento previo hallado en el estudio del tejido adherencial y de la población celular, nos preguntamos si era posible la eliminación de esta complicación quirúrgica.

Tras haber demostrado que los 7 días representan el momento de iniciación de la diferenciación celular y estabilización tisular, definimos los 3 días post-cirugía como el momento en el que el tejido adherencial muestra un perfil más adecuado para realizar la resección adherencial. En nuestro tercer objetivo, nos planteamos diversos puntos:

- 1) Diseño de un modelo de laparoscopia secuencial para la evaluación del proceso de formación/reformación adherencial a corto y largo plazo.
- 2) Estudio de la eficacia de la resección adherencial en la prevención de la reformación adherencial. La elección de este momento (3 días) se realizó en base a los resultados obtenidos a partir de los objetivos anteriores.
- 3) Análisis de la evolución del tejido adherencial a largo plazo (90 días post-implante).

3.3.1 MATERIAL Y MÉTODOS

3.3.1.1 ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Fueron empleados 16 conejos blancos Nueva Zelanda, machos, de un peso aproximado de 3000-3200g al comienzo del estudio. Los animales fueron estabulados en condiciones de luz y temperatura constantes durante todo el tiempo de estudio, según se detalló en el primer objetivo. El manejo de los animales se hizo conforme a la Normativa Internacional vigente sobre animales de experimentación (CEE 2871-22 A9).

3.3.1.2 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

El procedimiento quirúrgico se realizó de la manera detallada en el primer objetivo. La técnica anestésica y el implante protésico empleado fueron los mismos entonces descritos.

3.3.1.3 TÉCNICA LAPAROSCÓPICA

La laparoscopia se realizó empleando una torre de laparoscopia que disponía de dos pantallas y sistema de videograbación (**figuras 61 y 62**). Se realizó una incisión cutánea de 0.5-0.6 cm en la vertiente lateral derecha del abdomen del animal.

Posteriormente, se procedió a la incisión del plano muscular y peritoneal para introducir un trocar metálico con llave para insuflación (Karl Storz, Tubingen, Germany) (**figuras 61 y 62**) en la cavidad peritoneal para el acceso con el laparoscopio. y se fijó el trocar con una sutura, para evitar su desplazamiento. La óptica empleada fue una óptica de visión STORZ (Karl Storz, Tubingen, Germany) de 3 mm y 0°. El neumoperitoneo se efectuó con CO₂, alcanzando una presión máxima de 8 mm de Hg. Una vez insuflada la cavidad peritoneal, se llevó a cabo el estudio laparoscópico que nos permitió realizar la visualización y grabación de las imágenes para su posterior análisis comparativo (**figura 62**).

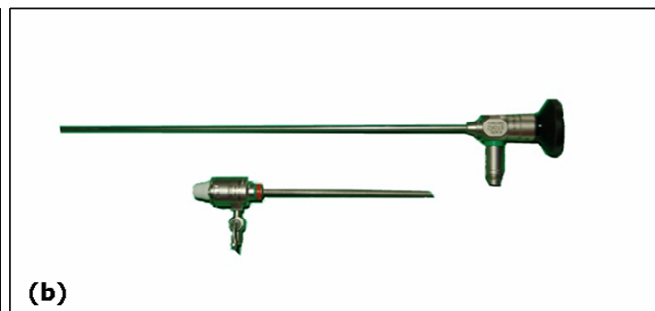


Figura 61: (a) Torre de laparoscopia utilizada. (b) Laparoscopio y trocar empleados para la realización de la técnica laparoscópica.

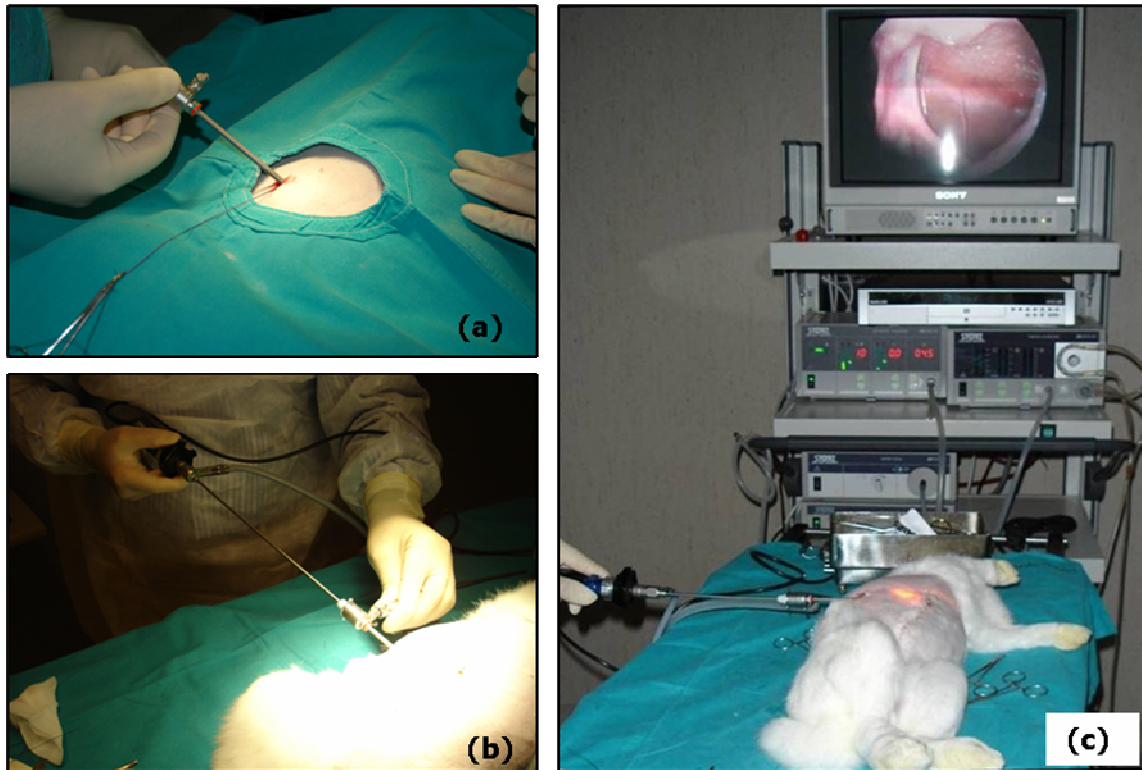


Figura 62: Realización de la técnica laparoscópica. (a) Colocación del trocar para el acceso a la cavidad peritoneal del animal; (b) Introducción del laparoscopio a través del trocar; (c) Visualización del estado de la malla y la formación adherencial.

La resección adherencial realizada en el grupo experimental 3 días postcirugía se llevó a cabo con la ayuda de unas pinzas laparoscópicas de agarre y disección curvas (Autosuture, Covidien, Mansfield, MA) (**figura 63**). Para ello, éstas se introdujeron en la cavidad peritoneal a través de una incisión accesoria efectuada en la vertiente lateral derecha del abdomen del animal.



Figura 63: Resección de las adherencias a los 3 días post-implante con ayuda de unas pinzas laparoscópicas curvas.

3.3.1.4 GRUPOS DE ESTUDIO

GRUPO I (CONTROL) (n=8): En los animales del grupo control se procedió al implante del material protésico (polipropileno) según el modelo adhesiogénico descrito en el primer objetivo.

GRUPO II (ADHESIOLISIS) (n=8): En los animales de este grupo se realizó el implante del material protésico (polipropileno) de igual manera que en el grupo I (control) y se procedió a realizar la resección laparoscópica de las adherencias formadas a los 3 días post-implante.

Se evaluó mediante laparoscopia secuencial la formación de adherencias, la resección de las mismas (grupo II), y el comportamiento general en la interfaz peritoneal en cada animal a los 3, 7, 14 y 90 días.

3.3.1.5 ESTUDIOS MORFOLÓGICOS

Todos los animales (ambos grupos de estudio) fueron sacrificados a los 90 días post-implante, momento en el que se realizó la toma de muestras de los materiales protésicos y del tejido adherencial presente en los animales del grupo control (grupo I).

Para el estudio de este tejido, se realizaron las mismas técnicas ya descritas en el objetivo 1. Se llevaron a cabo estudios de la superficie de la malla de zonas cubiertas por adherencias, zonas sometidas a resección adherencial y zonas libres de adherencias. Estas muestras fueron sometidas a microscopía electrónica de barrido y a microscopía óptica, según los procedimientos ya descritos en el primer objetivo. Las tinciones realizadas fueron hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson y rojo Sirio.

Microscopía electrónica de barrido

Como fijador se empleó glutaraldehído al 3%. Transcurridas entre cuatro y cinco horas, el fijador fue sustituido por tampón Milloning hasta el momento de la deshidratación. Esta se realizó con acetonas de concentraciones crecientes:

Acetona 30%	15 minutos
Acetona 50%	15 minutos
Acetona 70%	15 minutos
Acetona 90%	20 minutos
Acetona 100%	30 minutos

Tras la deshidratación, las piezas se colocaron en paquetes individuales de papel de filtro y se conservaron en acetona 100%. Posteriormente, se sometieron a punto crítico en un secador POLARON E3000 para su total desecación.

Finalmente, se montaron en platinas metálicas con cinta adhesiva de doble cara y se metalizaron con oro-paladio. La observación de las muestras se realizó en un microscopio electrónico de barrido ZEISS DMS-950.

3.3.1.6 CUANTIFICACIÓN DEL ÁREA CUBIERTA POR ADHERENCIAS

La cuantificación del área cubierta por adherencias se realizó mediante análisis de imagen para cada tiempo de estudio. Cuando los animales eran sometidos a laparoscopia secuencial, la cuantificación se realizó digitalmente a partir de las imágenes obtenidas mediante videgrabación mediante la realización de plantillas digitales de la misma superficie que la malla (**figura 64**). En el momento del sacrificio y recogida de la malla (90 días), se dibujó el contorno de las adherencias sobre plantillas transparentes del mismo tamaño de la prótesis, que fueron posteriormente digitalizadas, para la comparación entre las mediciones realizadas a través de las imágenes obtenidas mediante laparoscopia y las medidas tomadas de manera directa.

Todas las plantillas fueron sometidas a un análisis de imagen con ayuda del programa MIP incorporado en el analizador de imagen (MICRON, Barcelona, Spain). Los resultados se expresaron como el porcentaje de la superficie de la malla ocupada por adherencias, del 0% (sin adherencias) al 100% (completamente cubierto por adherencias). Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar y fueron sometidos a análisis estadístico empleando el test de la U de Mann Whitney con el programa GraphPad Prism 4 para Windows XP.

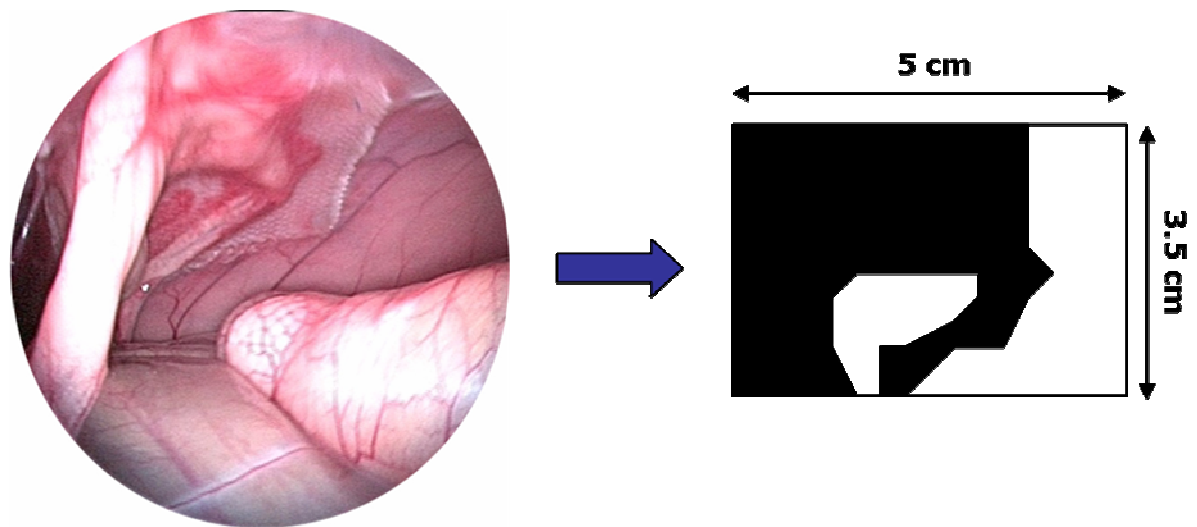


Figura 64: Realización de la plantilla para la determinación del área de la malla cubierta por adherencias a partir de las imágenes obtenidas mediante laparoscopia. Esta plantilla se sometió posteriormente a análisis de imagen.

3.3.2 RESULTADOS

No se produjo mortalidad post-operatoria de los animales, siendo todos ellos válidos para el estudio. Se observó buena tolerancia del biomaterial, no apreciándose signos de infección ni rechazo en ninguno de los animales.

3.3.2.1 OBSERVACIONES MACROSCÓPICAS

Las observaciones macroscópicas realizadas por laparoscopia revelaron que las adherencias ya se encontraban establecidas a los 3 días post-cirugía tanto en el grupo I (control) como en el grupo II (adhesiolisis) (**figuras 65 y 66**), no mostrando diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de ocupación por adherencias entre ambos grupos. La mayoría de ellas eran adherencias omentales que ya mostraban una incipiente neoangiogénesis desde el omentum hacia la malla. Tan sólo en algunos animales se encontraron adherencias que involucraran las asas intestinales. Sin embargo, a 3 días estas adherencias eran de tipo laxo, no mostraban signos de integración y no se observó neoangiogénesis desde la serosa intestinal hasta la malla de polipropileno ni al tejido subyacente. Eran adherencias de fácil disección. Y en la mayoría de los casos, el efecto de la presión producida por el neumoperitoneo realizado durante la laparoscopia producía su separación de la malla.

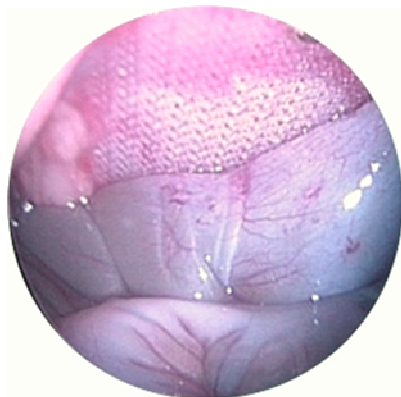
La realización de la laparoscopia secuencial en el **grupo I** (control) reveló que las adherencias observadas a 3 días post-cirugía se mantuvieron a lo largo de todos los tiempos de estudio. A 7 y 14 días post-cirugía se observaba una elevada respuesta angiogénica, tiempos a los que las adherencias ya no mostraban una apariencia laxa, sino un aspecto más compacto típico de adherencias de tipo firme o integrado (**figura 65**).

A 90 días, se observaba gran cantidad de tejido adiposo alrededor del tejido adherencial observado previamente, de manera que el volumen de tejido adherencial era superior a tiempos largos, aunque esto no representaba una diferencia significativa en cuanto al área de la malla cubierta por adherencias. Macroscópicamente, se encontró una disminución en la tasa de vasos sanguíneos.

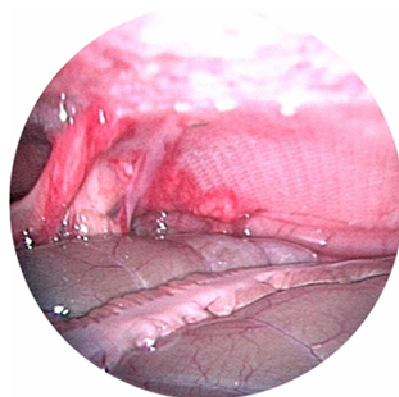
En el **grupo II** (resección adherencial), una vez realizada la resección de las adherencias, solo se encontraron adherencias en dos implantes a los 7 días post-cirugía, que se mantuvieron a lo largo de todo el tiempo de estudio. Eran adherencias que cubrían una superficie muy pequeña y periférica de la malla, coincidiendo

con los puntos de fijación del polipropileno. En el resto de los animales no volvieron a reformarse en ningún momento (**figura 66**).

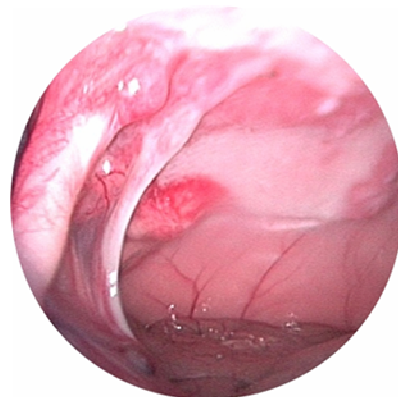
3 días



7 días



14 días



90 días

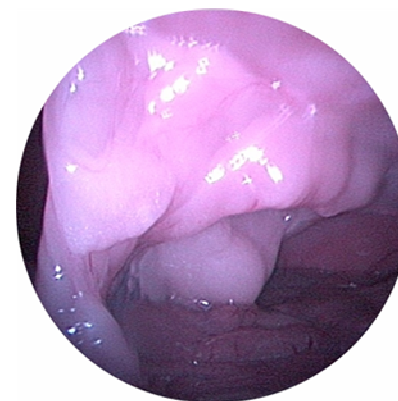
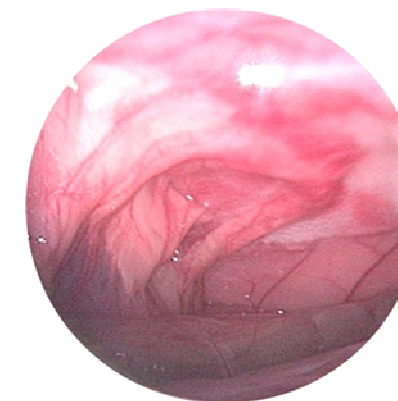
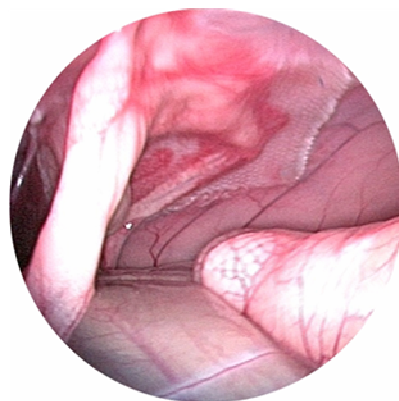
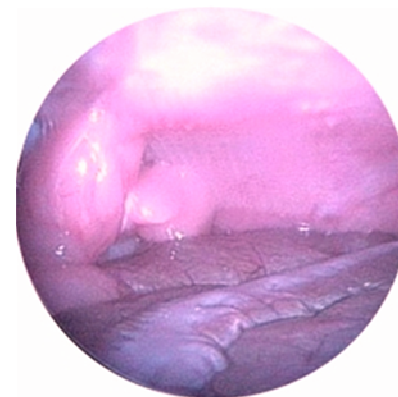
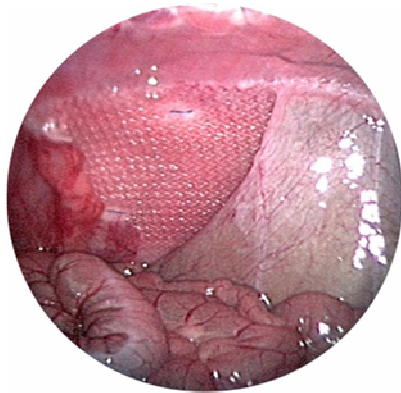
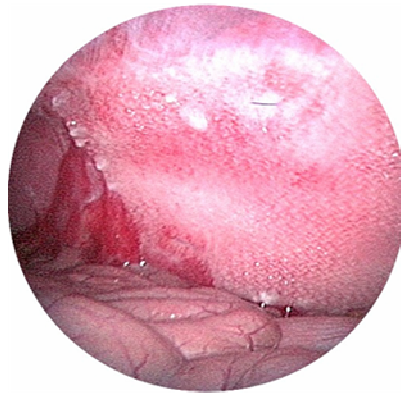


Figura 65: Vista por laparoscopia de la evolución de la formación adherencial en el **grupo I** (control)

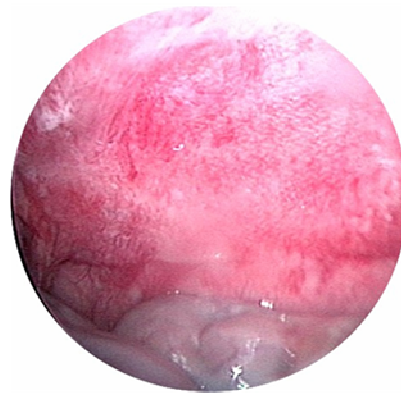
3 días



7 días



14 días



90 días

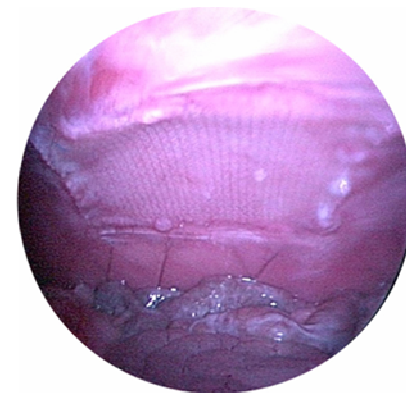
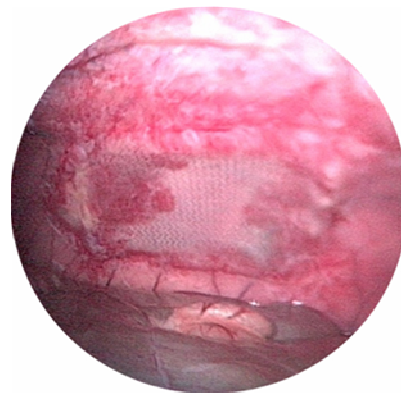
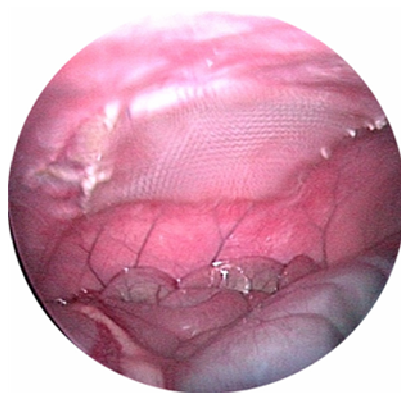
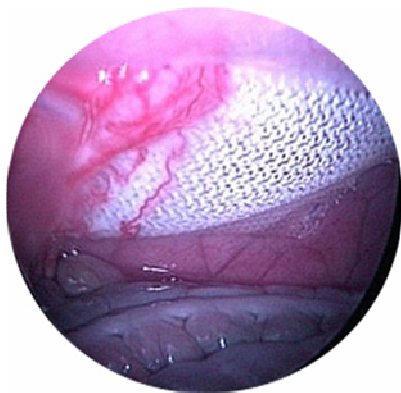
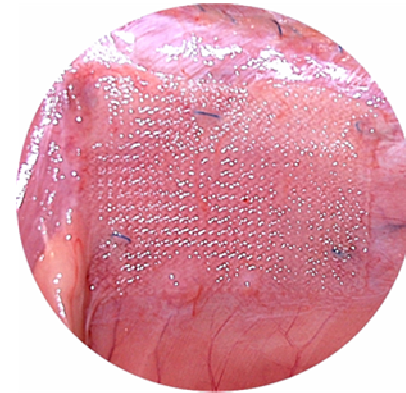


Figura 66: Vista laparoscópica de la evolución de la formación adherencial tras la resección adherencial a los 3 días post-implante en el **grupo II**.

3.3.2.2 ESTUDIOS MORFOLÓGICOS

Los estudios morfológicos realizados a 90 días mostraron una buena integración de la malla.

En el **grupo I** (control), se podía observar el tejido adherencial formado sobre la malla, en zonas donde se interrumpía la continuidad del mesotelio (**figuras 67 y 68**). La tinción con el rojo Sirio nos permitió analizar la diferente distribución del colágeno tipo I (colágeno maduro, en color rojo) y colágeno tipo III (reticulina, amarillo) en las muestras.

En general, el colágeno tipo I aparecía alrededor de los filamentos de polipropileno de la malla, así como en la capa más externa que cubría la superficie de la malla y los espacios entre filamentos, mientras que el colágeno tipo III se encontraba en áreas en proceso de remodelación de las capas más profundas entre los filamentos de polipropileno (**figura 69**).

Los estudios mediante microscopía electrónica de barrido mostraban una capa mesotelial dañada que dejaba expuesto el submesotelio, en el que podían apreciarse las fibras de colágeno y los remanentes de tejido adherencial. Se encontraban zonas con restos de fibrina y tejido omental adherido a la superficie de la malla de composición claramente adiposa (**figura 70**).

En el **grupo II** (resección adherencial) se encontró que, a los 90 días post-cirugía, la superficie de la malla presentaba un mesotelio reconstituido continuo con ausencia de tejido adherencial en, prácticamente, la totalidad de la malla (**figuras 67 y 68**). La tinción con rojo Sirio mostraba una cantidad superior de colágeno tipo III (inmaduro) con respecto a la encontrada en el grupo control. En este caso, el colágeno tipo I también se localizaba alrededor de los filamentos de polipropileno. Pero, al contrario que el grupo I, la capa más externa de las zonas sometidas a adhesiolisis se encontraba formada por colágeno tipo III y no por colágeno tipo I, poniendo de manifiesto el proceso de remodelación sufrido en estas muestras. Se encontraban restos de tejido adherencial, correspondientes al tejido adiposo observado macroscópicamente por laparoscopia. No obstante, el mesotelio subyacente a estos restos adherenciales se encontraba completamente restablecido, disminuyendo así la posibilidad de reformación adherencial (**figura 71**).

Las zonas sometidas a la resección adherencial mostraban, mediante microscopía electrónica de barrido, que la mayor parte de la superficie presentaba un mesotelio estable en estado quiescente (**figura 72**). Se observaban zonas desnudas cubiertas por células mesoteliales regenerantes en proceso de expansión y colonización de la superficie, integrándose en el mesotelio maduro. Existían pequeñas áreas en que el tejido conectivo submesotelial quedaba expuesto observándose restos de células sanguíneas y fibrina.

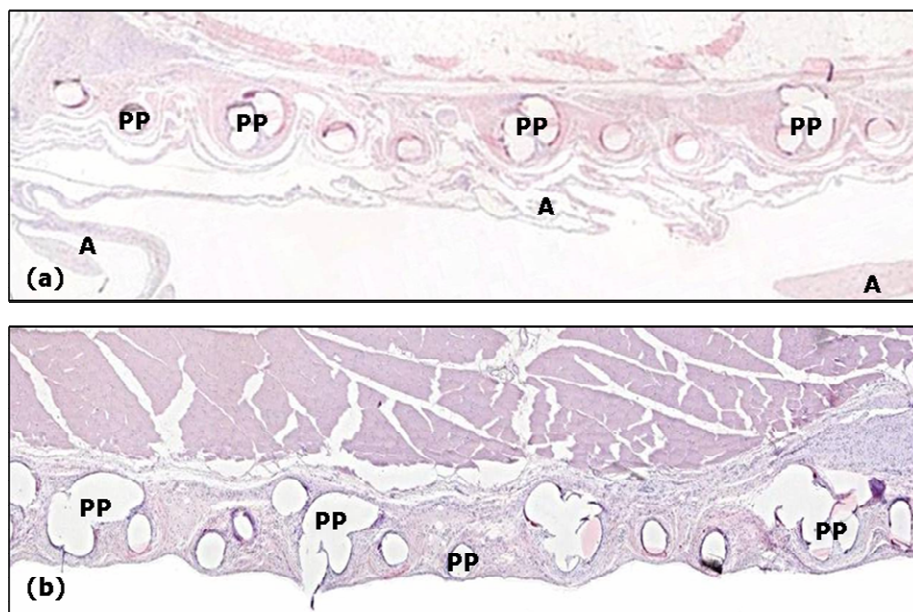


Figura 67: Vista paronámica de la superficie de la malla de propileno en (a) el **grupo I** (control) y (b) en el **grupo II** (sometido a resección adherencial) (Hematoxilina-eosina, 50x) a los 90 días post-cirugía. En el grupo I se observa la presencia de tejido adherencial (A) sobre la malla. En el grupo II se observa un mesotelio continuo que cubría la superficie libre de la malla, impidiendo la formación adherencial. PP, filamentos de la malla de polipropileno.

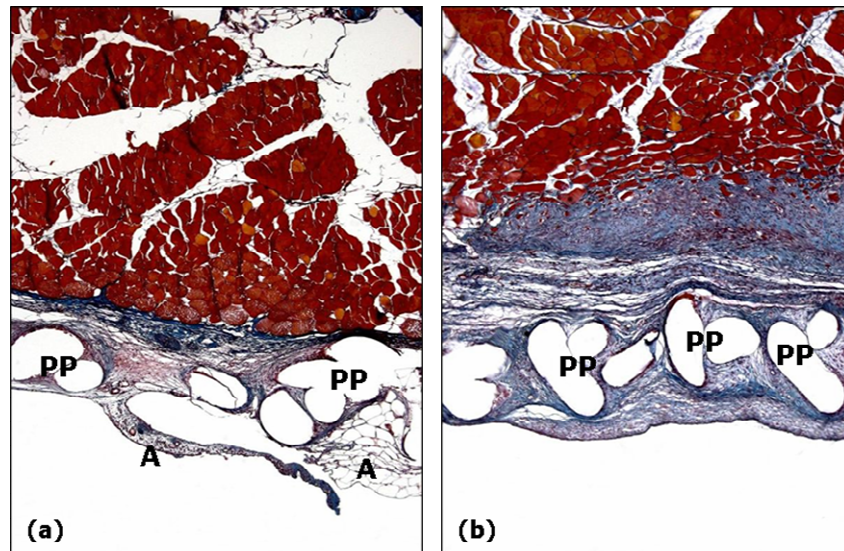


Figura 68: Vista paronámica de la superficie de la malla de propileno en (a) el **grupo I** (control) y (b) en el **grupo II** (sometido a resección adherencial) (Tricrómico de Masson, 100x) a los 90 días post-cirugía. Obsérvese la mayor cantidad de colágeno presente entre la capa muscular de la pared abdominal y la malla en el grupo II, que favorece la integración del biomaterial.

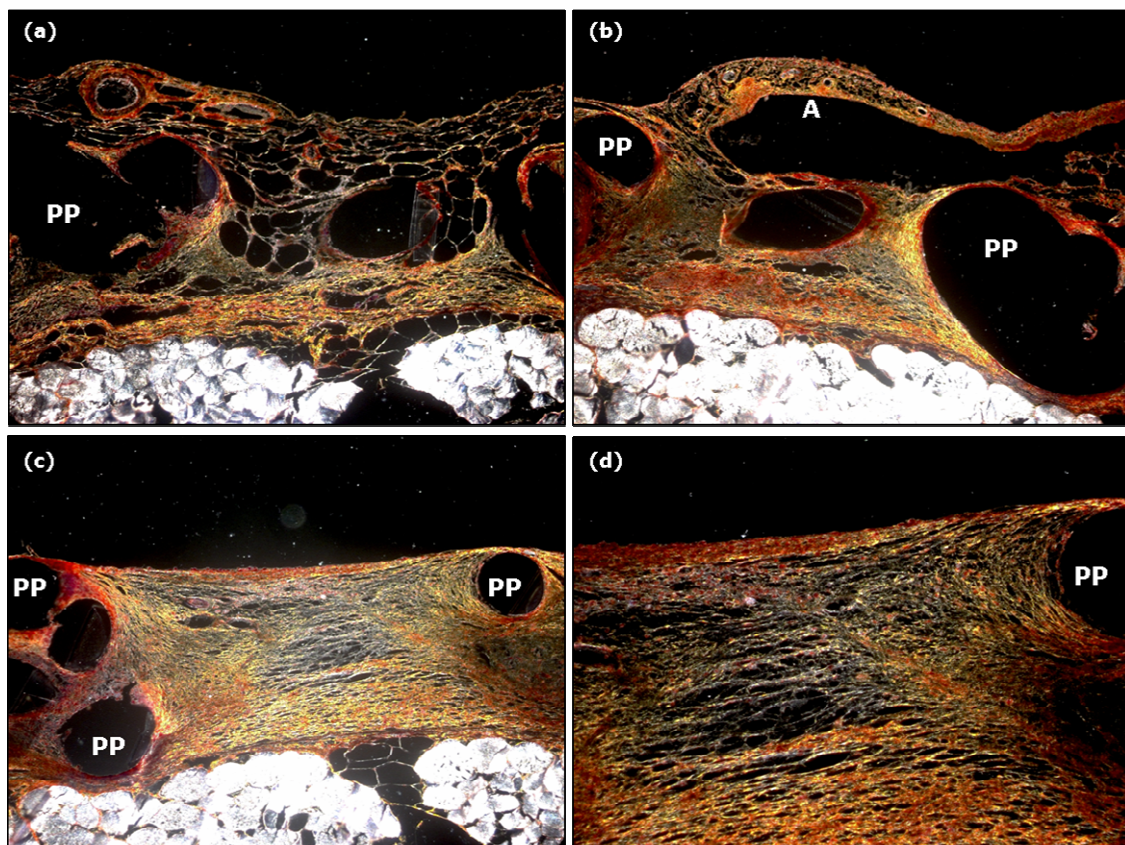


Figura 69: Imágenes de las secciones teñidas con rojo Sirio y observadas con luz polarizada en el **grupo I** (control) en zonas cubiertas por adherencias (a, 100x) y (b, 100x) y en zonas mesotelizadas (c, 100x) y (d, 200x).

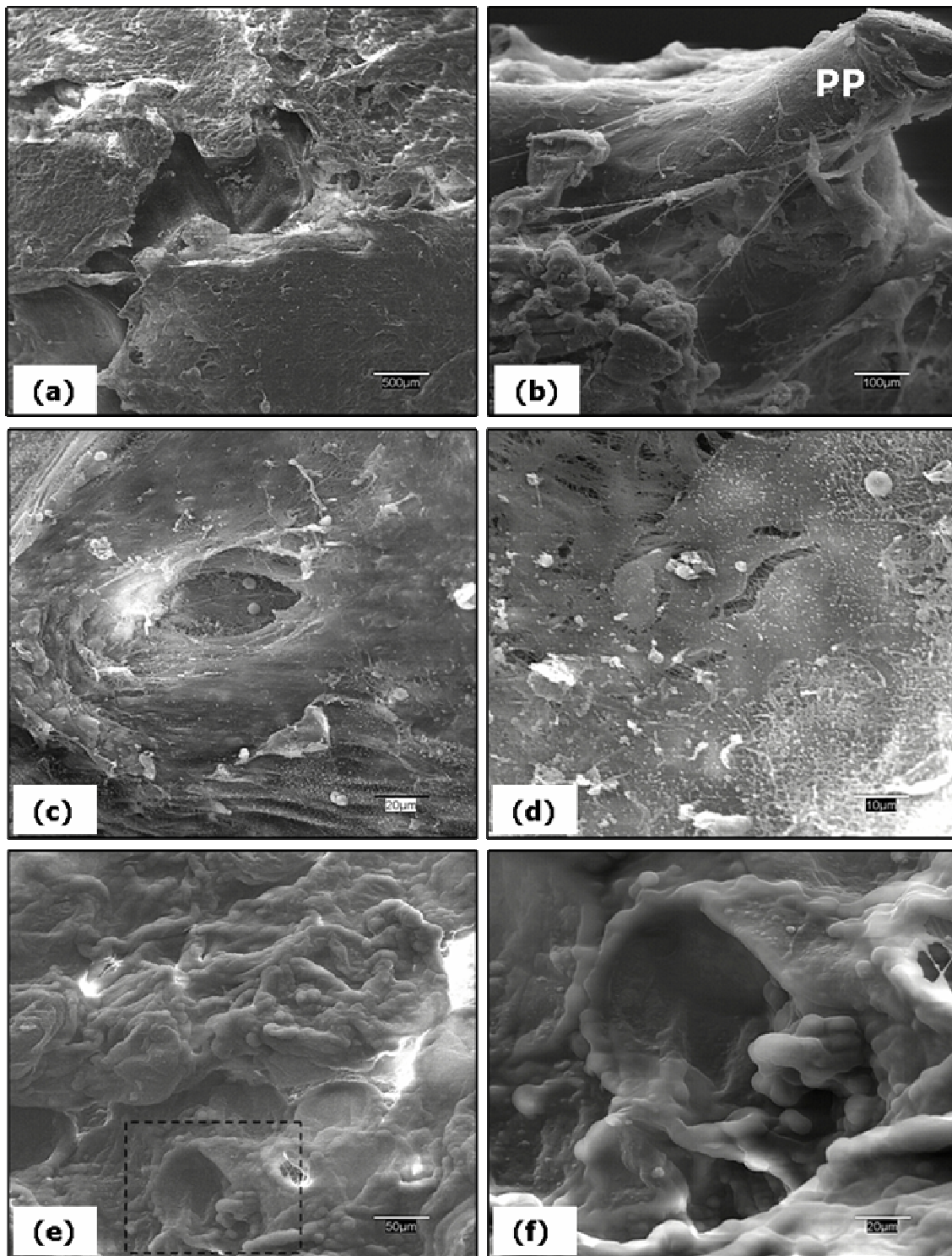


Figura 70: Imágenes de la superficie de la malla en el **grupo I** (control) 90 días post-implante a microscopía electrónica de barrido. Se observaban áreas de la malla no mesotelizadas con restos tisulares y alguna célula sanguínea (a, 20x; c, 500x; d, 1000x); (b) Filamento de polipropileno (PP) de la malla (100x). Se observaron zonas cubiertas por adherencias con morfología de tejido adiposo (e, 200x; f, 500x)

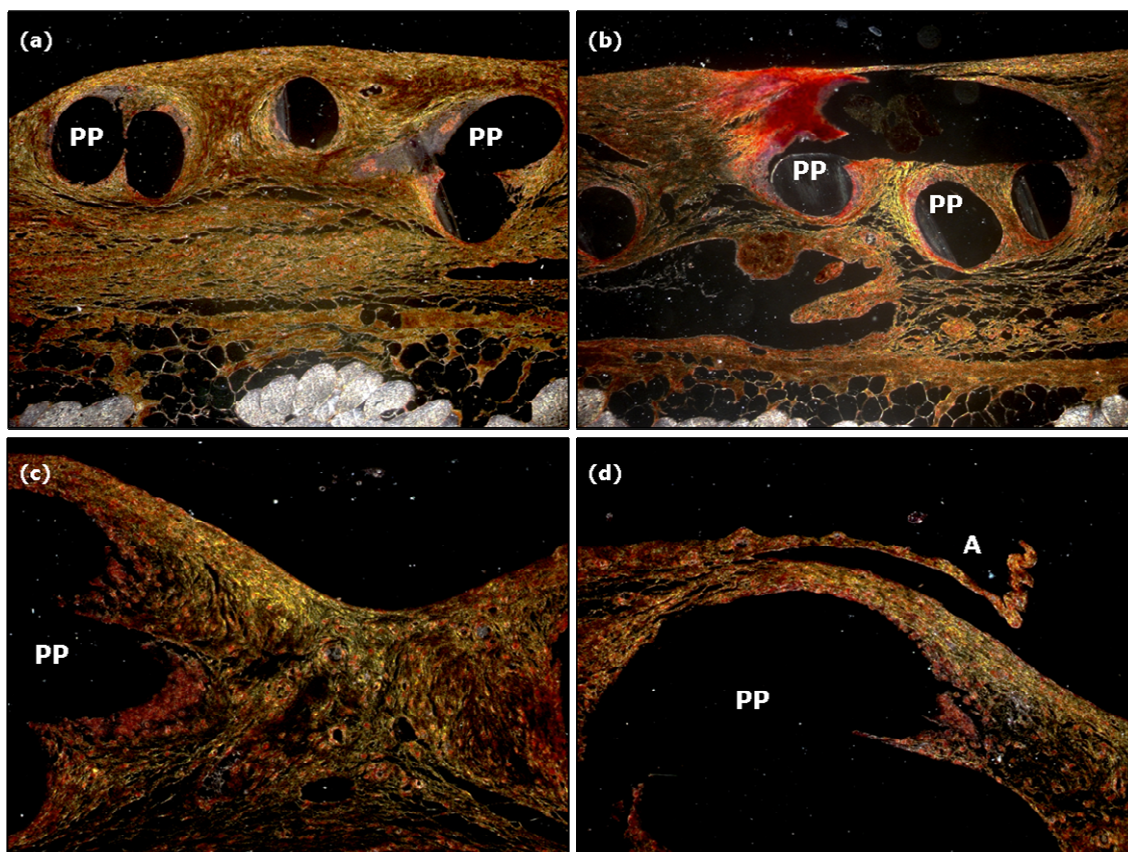


Figura 71: Imágenes de las secciones teñidas con rojo Sirio y observadas con luz polarizada en el grupo II. La mayor parte de la superficie de la malla estaba mesotelizada y mostraba la predominancia de colágeno de tipo III (a, 100x) y (c, 200x). La presencia de colágeno tipo I se encontraba en aquellas zonas sometidas a resección adherencial (b, 100x). Se observaron pequeños remanentes de tejido adherencial (d, 200x).

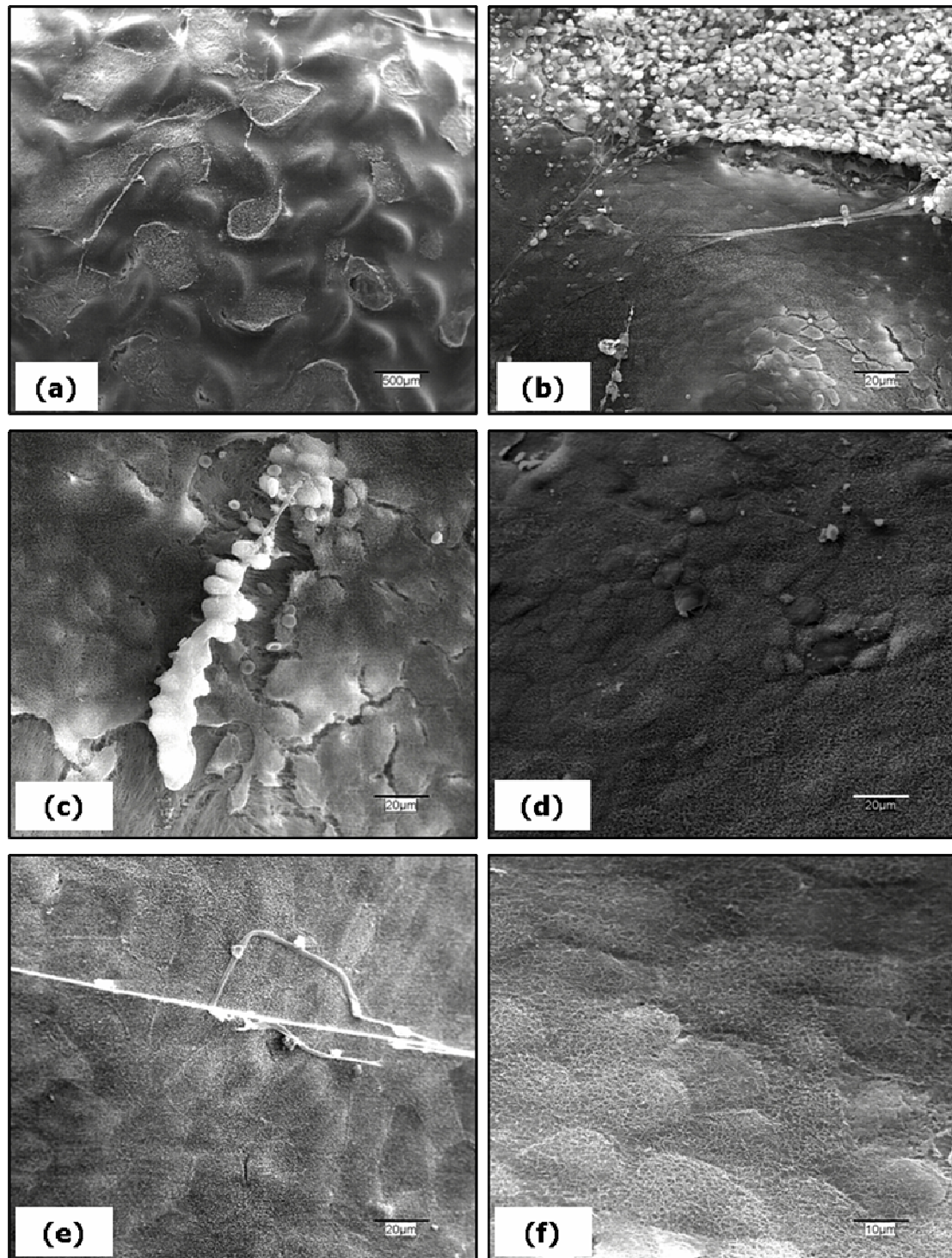


Figura 72: Imágenes de la superficie de la malla en el **grupo II** (resección adherencial) 90 días post-implante a microscopía electrónica de barrido. (a) En esta imagen, se observa la superficie de la malla mesotelizada por completo. Obsérvense los filamentos de polipropileno bajo el neoperitoneo formado (20x); (b) La mayor parte de la malla se encontraba mesotelizada y aquellas zonas que carecían de un mesotelio estable aparecían cubiertas de células mesoteliales en fase de expansión y células sanguíneas (500x); (c) Restos de la adherencia eliminada cubriendo un área libre de mesotelio (500x); (d) La mayor parte de la malla mostraba un mesotelio estable sobre su superficie (d, 500x; e, 500x; f, 1000x) en el que se encontraban algunos pequeños vasos sanguíneos (e).

3.3.2.3 CUANTIFICACIÓN DEL ÁREA CUBIERTA POR ADHERENCIAS

El cálculo del porcentaje del área de la malla cubierta por adherencias en ambos grupos de estudio y para cada uno de los tiempos establecidos mostró un ligero aumento a lo largo del tiempo en el **grupo I** (control), que resultaba estadísticamente no significativo ($p>0.05$) (**figura 73**). Esto podría deberse al aumento de volumen sufrido por el tejido adherencial a tiempos más largos (90 días) que, como ya veíamos macroscópicamente, no se reflejaba en un aumento importante de la superficie cubierta por adherencias.

En el **grupo II** (resección adherencial) se observó una reducción importante ($p<0.05$) en el porcentaje del área cubierta por adherencias a 7 y 14 días con respecto al tiempo previo a la eliminación de las adherencias. Entre ambos grupos de estudio se encontraban diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) en los tiempos posteriores a la resección adherencial (7, 14 y 90 días), mientras que no había diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$) antes de realizarse ésta (3 días) (**figura 73**).

Es importante no sólo el hecho de que se produzca una disminución en la extensión de la malla cubierta por adherencias como resultado de la eliminación de las adherencias, sino también el hecho de que el tejido adherencial remanente a 90 días en el grupo sometido a adhesiolisis no conectaba dos superficies opuestas y no involucraba a los órganos intraabdominales, a diferencia de lo observado en el grupo control.

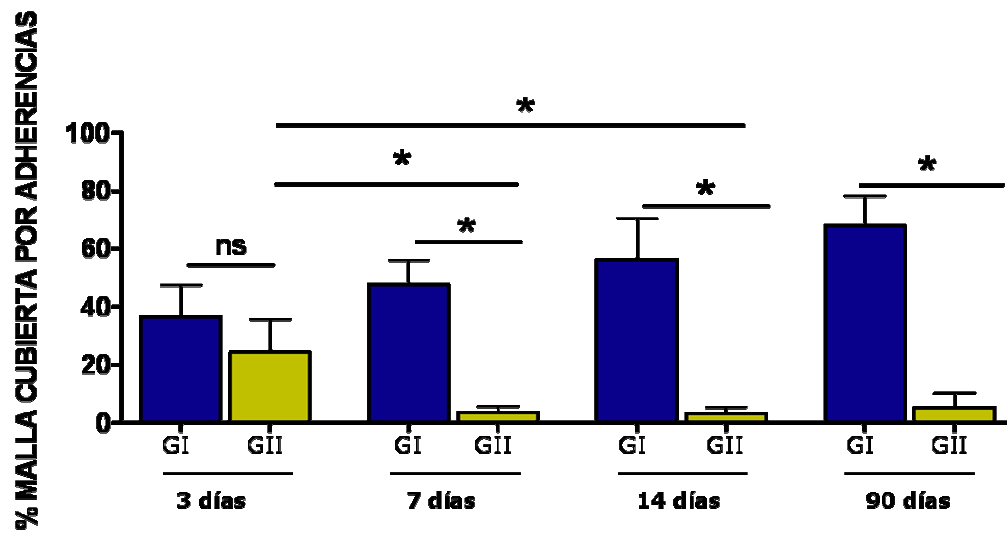


Figura 73: Porcentaje del área de la malla cubierta por adherencias en el **grupo control (GI)** y en el grupo sometido a resección adherencial (**GII**) para cada tiempo de estudio. El gráfico muestra la media \pm desviación estándar (* $p < 0.05$)

3.3.2.4 ESTUDIO DE LA ADHERENCIA A LARGO PLAZO

El tejido obtenido a los 90 días, delimitado por una capa mesotelial que presentaba algunas áreas de reactividad tisular, estaba compuesto en su mayoría por tejido adiposo bien diferenciado y maduro. Se encontraba la presencia de GO, y una escasa participación de células de tipo inflamatorio dispersas por el tejido (**figura 74**).

Las células inflamatorias/inmunes presentes en el tejido adherencial a 90 días eran, básicamente, algunos monocitos macrófagos (7,12% con respecto al número de células totales presentes en el tejido) y un discreto aumento para la población de linfocitos T CD4+ (1,39%) (**tabla 16**).

Se valoró, a este tiempo, el ambiente de factores de crecimiento o citocinas presentes en el tejido.

A este tiempo, la expresión de LAP-TGF β 1 volvía a aparecer a nivel de la capa media de los vasos y anclado en la matriz de las ya escasas zonas fibrosas con presencia fibroblástica/miofibroblástica (**figura 74**). La cuantificación de la proteína se mantenía en valores similares a los 14 días (**tabla 17**).

El TGF β 1 activo alcanzaba, a 90 días, valores similares a los hallados en la adherencias de 7 días mediante Western blot (**tabla 17**). Esta expresión se localizaba inmunohistoquímicamente tan solo en el endotelio vascular. La expresión génica era poco activa a este tiempo, aunque significativa con respecto al omentum control, comportándose como el tejido adherencial a los 3 días (**figura 74**).

El análisis inmunohistoquímico para el TGF β 3 mostraba una elevada expresión localizada en los GO y en células presentes en zonas reactivas dispersas, así como una discreta expresión en alguna célula mesotelial, en la matriz fibrilar y en el estroma del tejido adiposo (**figura 74**).

El betaglicano, en este tiempo, era expresado en su forma soluble en el interior de los vasos sanguíneos, en relación con la presencia de TGF β 1 activo (**figura 74**).

El marcaje con el anticuerpo anti-VEGF mostró su presencia en células mesenquimales y algunos linfocitos presentes en el estroma del tejido adiposo, así como un marcaje selectivo del lecho microvascular. Por el contrario, el endotelio de los grandes vasos podía ser observado por el contraste con el anticuerpo anti-TGF β 1 (**figura 74**).

El componente colágeno aparecía soportando la cubierta mesotelial y en las zonas de las membranas translúcidas, especialmente con localización adventicial. Las membranas translúcidas mostraron un engrosamiento y desarrollo tisular superior al que mostraban en el omentum control (**figura 75**). Se encontró una disminución en la cantidad de colágeno con respecto a tiempos anteriores debido a la predominancia del componente adiposo.

El análisis mediante RT-PCR mostraba niveles para la expresión génica del TGF- β 1, VEGF y colágeno tipo I intermedios a los observados para las adherencias de 3 y 7 días. En el caso del colágeno tipo III, la expresión era similar a la encontrada para las adherencias de 14 días. Tanto el TGF- β 1 como los colágenos tipo I y tipo III mantenían una sobreexpresión con respecto al omentum control (**tabla 17**).

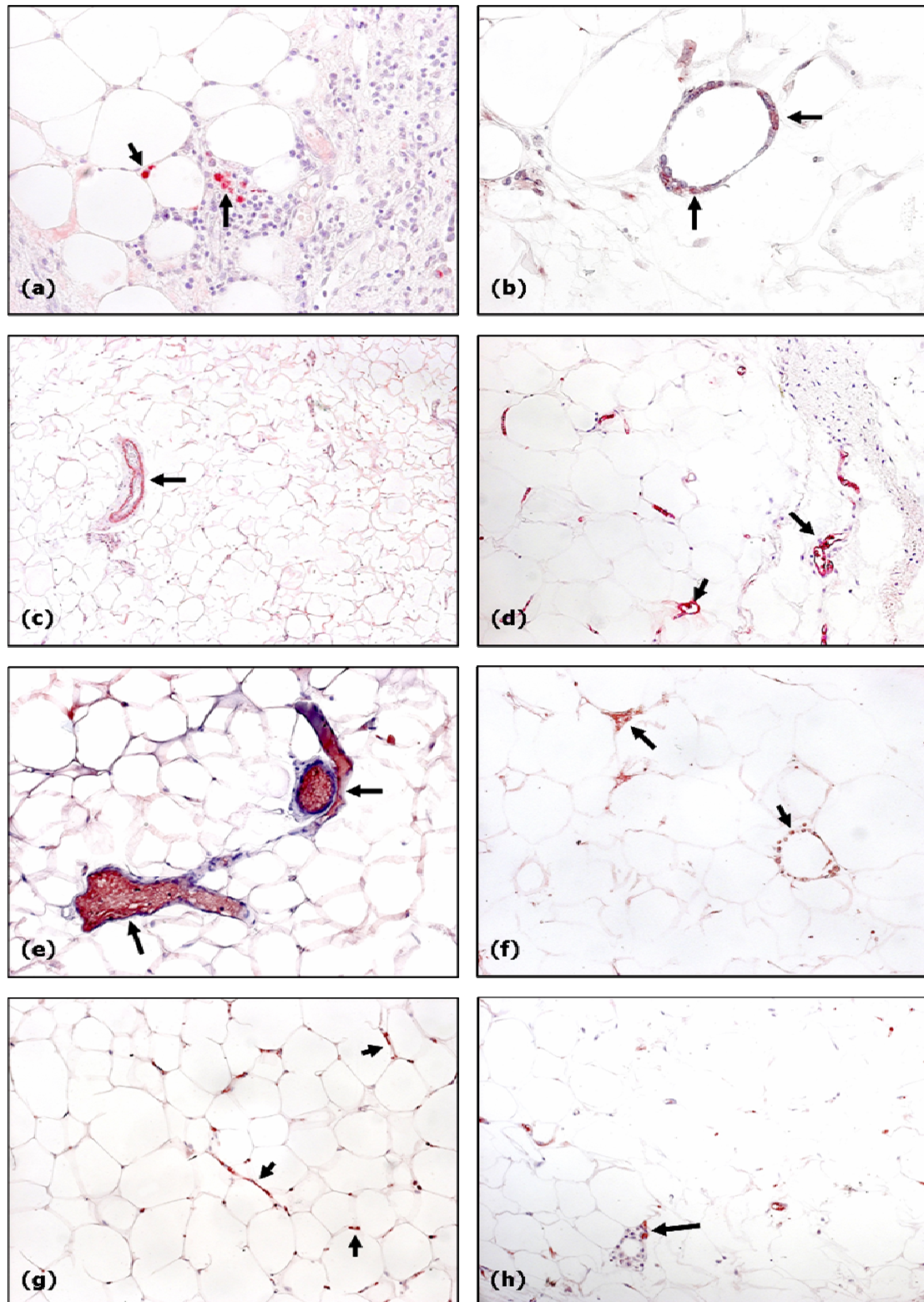


Figura 74: Inmunohistoquímica en el tejido adherencial de 90 días. (a) Presencia de células RAM-11 positivas (macrófagos) (→) (400x); (b) Linfocitos T CD4+ (→) en un glomérulo omental (400x); (c) LAP-TGF β 1 en la capa muscular vascular (100x); (d) TGF- β 1 a nivel del endotelio vascular (200x); (e) Betaglicano en su forma soluble a nivel del plasma (200x); (f) TGF- β 3 en el estroma del tejido adiposo y en células localizadas en los GO (200x); (g) VEGF (200x); (h) El marcaje con el anticuerpo anti-VEGF ponía de manifiesto el componente microvascular de los glomérulos omentales (200x)

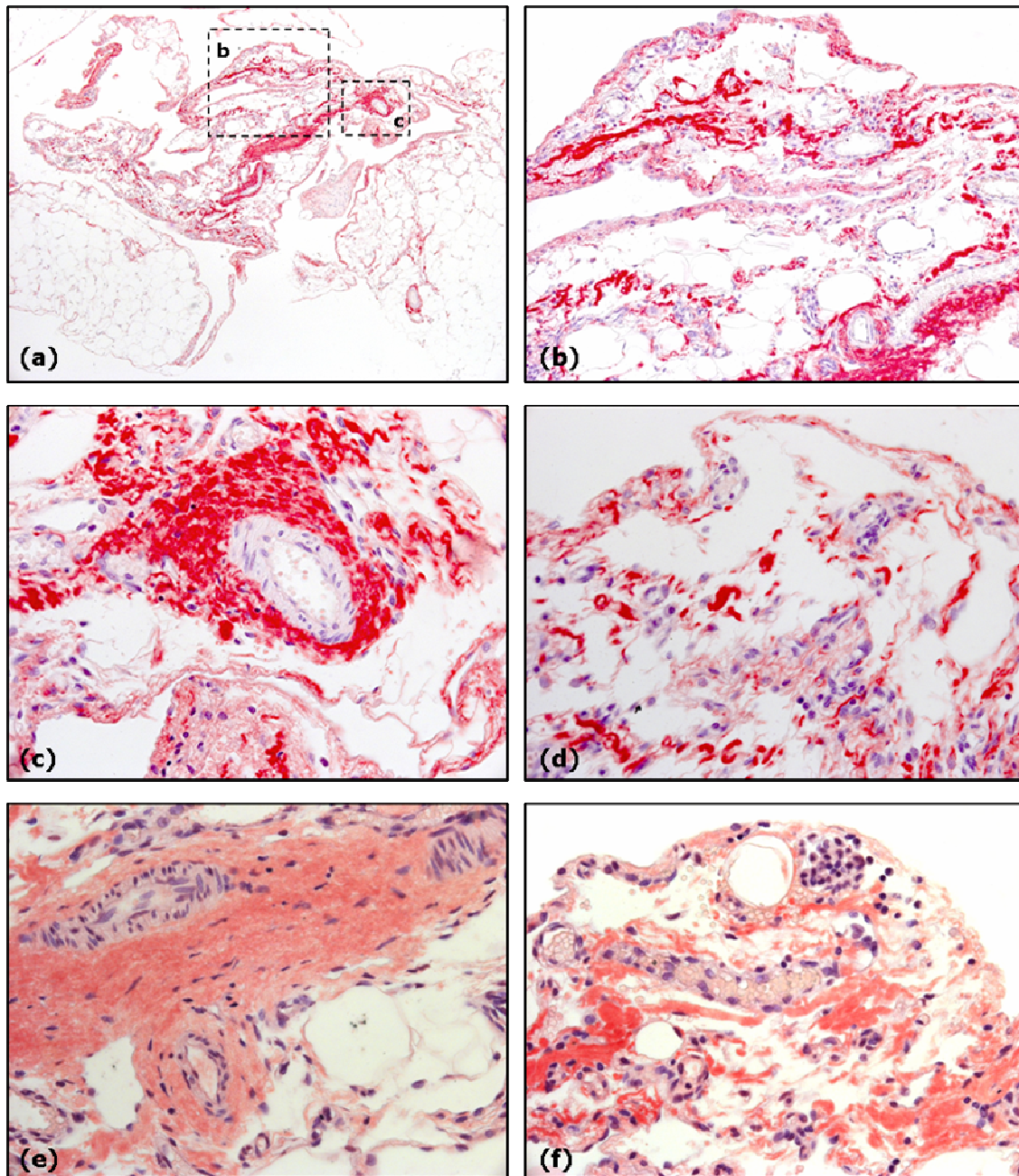


Figura 75: Componente colágeno en las adherencias de 90 días. Se muestra el marcaje inmunohistoquímico mediante los anticuerpos anti-colágeno tipo III (a, 50x; b, 200x; c, 400x y d, 400x) y anti-colágeno tipo I (e, 400x y f, 400x). Obsérvese la degradación de los haces de colágeno en d y f.

Resumen general de resultados en tejido

	Omentum Control	Adh (3 días)	Adh (7 días)		Adh (14 días)		Adh (90 días)
			R. Fib	R. Adip	R. Fib	R. Adip	
Macrófagos activados	0,03%	19,31%	9,62%	14,90%	6,81%	14,6%	7,12%
Linfocitos B activados	0%	0,5%	1,5%	4,5%	0,05%	0,05%	0,1%
Linfocitos T CD4 activados	0%	0,35%	1,5%	4,5%	0,10%	0,10%	1,39%
Linfocitos T CD8 activados	0%	3,78%	1%	3%	0,13%	0,13%	0%

Tabla 16: Porcentaje de células activadas

	Omentum Control	Adh (3 días)	Adh (7 días)		Adh (14 días)		Adh (90 días)
			R. Fib	R. Adip	R. Fib	R. Adip	
LAP-TGFβ1	+++	+++	+	+	+++	+	++
TGFβ1	+/-	++	+++	+	++	+	++/+++
TGFβ3	+	++	+	++/+++	+	++	++/+++
Betaglicano (soluble)	+	+++	-/+	-/+	+	++	++
Betaglicano (anclado)	-	+	+++	+	+	+++	+
VEGF	++/+++	++	+++	+++	+/++	+/++	+
α-actina de músculo liso	+/-	+	+++	+	+++	+	+
Colágeno III	+	++	+++	+	+	++	++
Colágeno I	+	+	+	+	+++	++	+/++
mRNA TGFβ1	+/-	++	+		+++		++
mRNA VEGF	++/+++	+	++		+++		+/++
mRNA Colágeno III	+/-	++	+++		+		+
mRNA Colágeno I	+/-	+	+		+++		+

Tabla 17: Valores semicuantitativos relativos a la expresión mostrada por el omentum control para cada marcador o gen. Escala utilizada: -, ausencia; +/-, mínima presencia; +, presencia moderada; ++, presencia intensa; +++, máxima presencia.

3.3.3 CONCLUSIONES

El estudio mediante laparoscopia secuencial nos permitió concluir que el momento crítico de la formación adherencial eran los tres primeros días. Las adherencias formadas a este tiempo, en ausencia de reintervención quirúrgica, continuaban su evolución hacia un tejido permanente, con predominancia del componente fibroso a corto plazo y con evolución tisular hacia tejido adiposo a los 90 días.

La resección adherencial a los 3 días post-implante resultaba en una reformación adherencial prácticamente nula, mostrando la idoneidad del tiempo elegido.

Las adherencias omentales a los 90 días estaban formadas, básicamente, por tejido adiposo maduro y células mesoteliales, con un perfil inmune (macrófagos y linfocitos T CD4⁺ activados) mantenido de forma conjunta a la presencia de citocinas proinflamatorias (TGF- β 1, TGF- β 3 y VEGF). Este perfil constituía una base de alerta inmunológica y de tolerancia al biomaterial. Por tanto, el tejido adherencial a largo plazo (90 días) se consolidaba como tejido omental, aunque manteniendo la alerta inmune ante la presencia de un material extraño.

4. DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

MODELO EXPERIMENTAL EMPLEADO

El estudio de las adherencias post-quirúrgicas humanas supone grandes dificultades. En primer lugar, los estudios realizados sobre tejido adherencial humano nos plantean el problema de la indeterminación de la madurez del tejido adherencial. La edad de este tejido suele estimarse, de manera aproximada, a partir del tiempo transcurrido desde la última intervención quirúrgica abdominal a la que fue sometido el paciente (Binnebösel y cols., 2008a). Sin embargo, no podemos tener la certeza de que las adherencias se hayan formado inmediatamente después del procedimiento quirúrgico.

En segundo lugar, la toma de muestras de tejido adherencial en humanos se realiza durante el transcurso y con motivo de segundos procedimientos quirúrgicos, por lo que la madurez de las muestras suele ir desde pocos meses a varios años, constituyendo una población de estudio muy heterogénea.

En tercer lugar, la formación adherencial puede presentarse de forma concomitante con otras patologías o afecciones. Lo que podría conducirnos a resultados y conclusiones erróneas en cuanto al ambiente tisular que presentan estas formaciones.

Y, por último, la imposibilidad del seguimiento evolutivo en los procesos de formación y reformación adherencial humanos debido a motivos éticos.

Todos estos factores hacen que el problema requiera del abordaje a través de modelos experimentales animales.

Los modelos adhesiogénicos comprenden, generalmente, la lesión peritoneal, ya sea parietal, visceral o ambas. Se basan en la abrasión cecal o peritoneal, la excisión peritoneal, la inducción de peritonitis (Ghellai y cols., 2000) o la producción de botones isquémicos mediante sutura del peritoneo (Gaertner y cols., 2008; Irkorucu y cols., 2009; Lim y cols., 2009). Muchos de estos modelos no son efectivos en la formación de adherencias en aquellas zonas donde son observadas más frecuentemente en la práctica clínica.

En nuestro caso, el agente inductor de las adherencias es la presencia de un biomaterial. Los materiales protésicos, con gran aplicación clínica en la reparación de grandes defectos en la pared abdominal (debidos a hernias incisionales o eventraciones, o

a resecciones por tumores) (van der Lei y cols., 1989; Molloy y cols., 1991) deben ser colocados, con frecuencia, en contacto con el peritoneo visceral. De manera que el uso de biomateriales supone un importante factor en la génesis de las adherencias peritoneales post-quirúrgicas (Bellón y cols., 2007a; Bellón y cols., 2009). Hemos optado por la interposición de un biomaterial en la pared peritoneal, simulando la reparación de la misma. Se ha empleado el polipropileno, una malla reticular de amplia utilización en clínica (Conze y cols., 2004; Bellón y cols., 2009) que produce frecuentemente la aparición de adherencias en la interfaz prótesis/peritoneo visceral. Esto es debido, probablemente, al retraso en la formación del mesotelio sobre la superficie de la vertiente visceral de la malla (Bellón y cols., 2000). La ausencia de este mesotelio podría provocar la aparición de microtraumas en el peritoneo de las vísceras que entren en contacto con el biomaterial, generando depósitos de fibrina que servirían como sustrato de la formación adherencial. Esta elevada capacidad adhesiogénica de las mallas de polipropileno las hace de uso común en modelos de formación adherencial (Matthews y cols., 2003; Felemovicius y cols., 2004; Conze y cols., 2004).

Nuestro diseño contempla, a diferencia de trabajos previos de nuestro grupo (Bellón y cols., 2007b; Bellón y cols., 2007c), la colocación del biomaterial sobre el peritoneo parietal de la cavidad y no en sustitución de la pared abdominal. De manera que se respeta, en la medida de lo posible, la integridad del peritoneo parietal subyacente y no conlleva los elementos propios del proceso reparativo de las capas que componen la pared. Siendo un modelo adhesiogénico mucho menos agresivo que los empleados normalmente. Este modelo ha mostrado una baja incidencia de formación adherencial a partir de la serosa intestinal o visceral, limitándose básicamente a la formación de adherencias de tipo omental. Así se facilita la evaluación de estas mediante laparoscopia. Este modelo muestra, además, una elevada reproducibilidad. Dando lugar en todos los casos a adherencias omentales de manera precoz y siempre en las mismas zonas de la malla. El elevado porcentaje de adherencias omentales encontrado generalmente en la clínica (Menzies y Ellis, 1990) nos llevó a centrar nuestro interés en el tejido adherencial formado a partir de él.

El animal de experimentación que hemos elegido para nuestro estudio ha sido el conejo blanco de Nueva Zelanda, a diferencia de la mayoría de los modelos

adhesiogénicos que normalmente utilizan la rata (Ghellai y cols., 2000; Gaertner y cols., 2008; Costa y cols., 2009; Schreinemacher y cols., 2009; Yilmaz y cols., 2009), por ser un animal muy sensible a la infección y a los materiales extraños, con el que nuestro grupo tiene una gran experiencia en el campo de las mallas abdominales. Posee un tamaño medio que permite fácilmente su manipulación, especialmente para el desarrollo de las técnicas laparoscópicas empleadas en nuestro estudio. Además, la estructura y composición del omentum de este animal son similares a los del humano y el ratón (Wilkosz y cols., 2005).

La principal ventaja del estudio por laparoscopia es que, a diferencia de los estudios clásicos, nos permite el estudio evolutivo de las adherencias en un mismo animal, disminuyendo el número de animales a utilizar y evitando su sacrificio a cada uno de los tiempos de estudio (Bellón y cols., 2007c).

PAPEL INMUNOLÓGICO DEL OMENTUM

El tejido adherencial estudiado mostró una importante reactivación de la capa más superficial o mesotelial en comparación con el omentum de animales sanos. Una de las características morfológicas de esta activación tisular es la presencia de áreas submesoteliales proliferativas formadas por una población de células indiferenciadas y células blancas. Dentro de estas áreas, es posible observar la presencia de los glomérulos omentales (GO) en posiciones más profundas que pronto comienzan a ser lugares fundamentales para la proliferación y migración de leucocitos. El lugar adherencial donde el omentum se continúa con el tejido que recubre el biomaterial formado se caracteriza por ser un lugar activo en la presencia de estas áreas celulares inflamatorias.

Al contrario de lo sugerido por algunos autores (Shimotsuna y cols., 1993), la localización de los GO no se encuentra restringida al área de la superficie tisular. Sino que, al menos en el conejo, los hemos observado también en el interior del tejido adiposo. Lo que nos hace suponer que deben desempeñar otras funciones más allá de proveer de macrófagos a la cavidad peritoneal.

Hemos observado la expansión de los GO en el tejido adherencial tras la interposición del biomaterial y, dentro de ellos, la presencia de células macrofágicas y linfocitarias, cuya presencia varía según la evolución de dicho tejido. Este es un proceso gradual que alcanza a los siete días su máxima expresión en cuanto a la respuesta

linfocitaria y podría ser vinculado a la capacidad de respuesta ante la presencia de un tejido extraño, reafirmando el papel inmunológico de este tejido linfoide organizado.

La presencia macrofágica se encuentra, por su parte, elevada entre los 3 y 7 días. Los primeros macrófagos activados aparecen en la cubierta mesotelial y submesotelio, pasando a manifestarse en los GO más interiores a tiempos más largos. Según algunos autores, los glomérulos omentales son, aparentemente, la principal fuente de macrófagos peritoneales (Wijffels y cols., 1992; Zhu y cols., 1997). Estos se encuentran presentes en los GO en diferentes estados de maduración y pueden entrar y salir de ellos fácilmente (Zhu y cols., 1997).

Beelen y cols. (2005) describen a los GO como un tejido linfoide perivascular muy reactivo asociado al omentum, que se encuentra muy relacionado con muchos aspectos de la función de las células B y T. Y con un papel preponderante en la respuesta a la infección bacteriana, la diálisis, la defensa de la diseminación metastática tumoral (Hagiwara y cols. 1993) y las respuestas inflamatorias. En estas circunstancias, los GO aumentan su número y tamaño, desarrollando en su interior centros germinativos productores de anticuerpos.

Es bien conocida la capacidad del omentum para adherirse a zonas dañadas favoreciendo su reparación o la prevención de infecciones (Cannaday, 1948; Liebermann-Meffert, 2000; Goldsmith, 2004; Vernik y Singh, 2007), o bien localizar un cuerpo extraño al organismo y expandirse para encapsularlo y evitar, de esta manera, su contacto con el resto de los órganos internos (Litbarg y cols., 2007). Aunque algunos autores consideran a los glomérulos omentales como un tejido linfoide secundario en la cavidad peritoneal (Mandache y Moldoveanu, 1987; Shimotsuma y cols., 1989; Di Paolo y cols., 2005), los resultados encontrados por van Vugt y cols. (1996) sugieren que son estructuras linfoides en sí mismas, asociadas con el sistema vascular en el que macrófagos y linfocitos se desarrollan y maduran.

En el humano, los glomérulos omentales están compuestos por macrófagos (70%), linfocitos B (10%), linfocitos T (10%), mastocitos y células estromales mesenquimales (Platell y cols., 2000). Según algunos autores, un porcentaje considerable de las células que integran las GO derivan de la médula ósea y llegan hasta las GO a través del sistema vascular (Goodman, 1964).

En nuestro estudio, hemos observado la presencia de células con características mesenquimales asociadas a los glomérulos omentales (GO).

Pinho y cols. (2005) demostraron que el contacto directo entre las células del estroma y los progenitores de células linfoides era necesario para la supervivencia y la diferenciación de estas últimas en respuesta a una serie de factores de crecimiento y citocinas producidas por las células del estroma, ya que las células estromales omentales son capaces de mantener la linfopoyesis de las células B de forma permanente. Se ha mostrado la capacidad de producción de citocinas linfopoyéticas (IL-7, FL) y mielopoyéticas (GM-CSF, M-CSF) por parte del estroma omental (Zhu y cols., 1997; Pinho y cols., 2005). Los precursores de células B serían dependientes del estroma omental y no podrían ser liberados a la cavidad peritoneal (Kuwata y cols., 1999).

Pinho y cols. (2005) mostraron que las células progenitores linfoides y mieloides eran células residentes permanentes en el omentum. E hipotetizaban que son remanentes de la producción fetal de progenitores sanguíneos y que representan una parte del sistema protector primitivo de baja especificidad.

Hemos observado que las células mesenquimales dispersas proliferan y se van diferenciando hacia tejido omental con todos sus componentes. Sin embargo, creemos que va a ser la disposición y la presencia de estas áreas reactivas la que determine la diferenciación tisular.

Si el lugar de la adherencia primitiva puntual donde el tejido omental fue erosionado coincide con una zona de GO, este tejido reaccionará recreando tejido adiposo como la ubicación primitiva. Consolidándose, posteriormente, una adherencia de tipo adiposo. En nuestros resultados, hemos observado que las áreas con adipocitos regenerantes se sitúan siempre en torno a una GO. Como comentaremos posteriormente, posiblemente sea la concentración de ciertas citocinas la que determine la diferenciación de este tejido.

Por el contrario, si el lugar de anclaje del tejido omental al biomaterial es pobre en GO tan sólo las células indiferenciadas y las células inmunes dispersas conformarán un lugar de diferenciación tisular presidido por estímulos de diferenciación conectiva que evolucionarán hacia tejido fibroso. Nuestros hallazgos confirman este hecho mostrando áreas de tejido adherencial mayoritariamente formadas por miofibroblastos en aquellos lugares donde no apreciamos el desarrollo de los GO.

Los GO, considerados como tejido linfoide en el omentum serían, por tanto, lugares de defensa inmunológica en los primeros momentos tras la apertura de la cavidad abdominal e interposición de un biomaterial. Y el proceso reparativo comenzaría estimulado por el medio ambiente que rodea a este punto inicial.

El papel de los GO como lugar de defensa y proliferación linfocitaria ha sido citado por la mayoría de los autores (Cranshaw, 1990; Cui, 2002; Di Paolo, 2005). Sin embargo, ninguno de ellos hasta la fecha ha intentado relacionar la presencia de estas estructuras como lugares condicionantes de la diferenciación tisular. Creemos que este punto de vista aporta una nueva visión sobre el tejido linfoide y su función, al menos, dentro de la cavidad abdominal.

Por ello, cualquier proceso que conlleve una alteración del sistema inmunológico de la cavidad peritoneal, estimularía el proceso de diferenciación celular. Si además añadiésemos un proceso cicatrizal, como puede ser cualquier agresión de la cavidad abdominal, se generaría un mecanismo de cicatrización y regeneración del tejido subyacente. Pudiendo sugerir que la diferencia entre la adherencia fibrosa y adiposa radica en la diferencia entre el proceso de reparación cicatrizal y el proceso de regeneración tisular.

EFECTO DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO

Las adherencias son consideradas como una complicación del proceso cicatricial tras una lesión, daño, infección o proceso neoplásico en la cavidad abdominal, por lo que algunos autores las consideran como una cicatrización por segunda intención (Cahill y Redmond, 2008).

La respuesta del mesotelio a una lesión se inicia de forma local. Sin embargo, es capaz de desencadenar una serie de eventos controlados por diferentes quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento implicados directamente en la formación adherencial. Así como por la expresión o actividad de sus receptores.

Existe un amplio abanico de citocinas y quimiocinas implicadas en el inicio, desarrollo y maduración de las adherencias abdominales. La amplia revisión efectuada por Cahill y Redmond (Cahill y Redmond, 2008) nos muestra la relevancia de varias de ellas, destacando el TGF- β , el TNF- α y el VEGF como las más estudiadas en relación a la

formación adherencial postoperatoria. Nosotros hemos centrado este estudio en la acción de dos de ellas: el TGF- β y el VEGF.

FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE - β

Aunque los mecanismos de formación de la adherencia no están del todo claros, es opinión generalizada que el aumento local en los niveles de TGF- β , ya sea a nivel tisular en el lugar de la lesión o en el líquido peritoneal, induce la formación adherencial (Chegini, 1997; Kim y cols., 1998; Ghellai y cols., 2000).

La ausencia de estudios que muestren la regulación temporal de las isoformas del TGF- β en la formación adherencial nos ha llevado a estudiar estos factores. Este análisis requiere del desarrollo de un modelo experimental animal consistente y reproducible que nos proporcione tejido adherencial formado bajo condiciones similares, sometido a un ambiente similar y cuya madurez podamos conocer a ciencia cierta. Tal y como ha demostrado comportarse el modelo adhesiogénico empleado en este estudio.

Frank y cols. (1996) mostraron que cada una de las isoformas del TGF- β se expresa en una zona diferente de las heridas, manifestando la importancia de su distribución espacial en el proceso de cicatrización cutánea. Por el contrario, el estudio de la distribución tisular de TGF- β 1 y TGF- β 3 en adherencias humanas no mostraba variaciones en la localización de ambas isoformas (Chegini y cols., 2001). Esta contradicción entre la reparación cutánea y la reparación en la cavidad peritoneal es otro de los motivos que nos han llevado al estudio de estos factores en nuestro modelo.

Curiosamente, nuestros resultados muestran una exclusión prácticamente completa en la localización del TGF- β 1 y el TGF- β 3. Y la presencia de uno u otro parece determinar el tipo de adherencia formado.

TGF- β 1

Tras una lesión, como puede ser la provocada por la colocación de la malla, se produce la liberación plaquetaria de TGF- β 1 inactivo en el sitio de la herida. Éste puede ser eliminado del lugar de secreción, retenido localmente a través de la unión a componentes de la matriz extracelular (LTBP, latent TGF- β 1 binding protein) o activado mediante proteólisis entre el LAP y la forma madura del TGF- β 1 (Clark y Coker, 1998).

Cuando esta fuente de TGF- β 1 desaparece del lugar dañado, el factor de crecimiento será reemplazado por el TGF- β 1 derivado de macrófagos y fibroblastos.

Ya que la forma madura del TGF- β 1 es la que puede ejercer la función biológica a través de la unión a sus receptores (Miyazono y Heldin, 1991), la activación de la forma latente constituye un importante punto de control en su acción. Esta activación requiere de una serie de factores ya comentados que, en general, van a estar presentes en la cavidad peritoneal tras la interposición del biomaterial, como factores predisponentes en el desarrollo de adherencias.

El estudio de la actividad y efectos del TGF- β resulta complicado, ya que es capaz de producir una gran variedad de respuestas que son reguladas a numerosos niveles. En primer lugar, se controla la producción de TGF- β a nivel transcripcional, donde hay diversos mecanismos que regulan la expresión tanto de las diferentes isoformas del TGF- β como de sus receptores. Y, en segundo lugar, existen mecanismos a nivel postranscripcional que controlan la disponibilidad del TGF- β activo, el acceso a sus receptores, la actividad de esos receptores, y la función nuclear de los complejos transcripcionales que se generan por esta vía (Roberts, 1998; Massagué y Chen, 2000).

La regulación transcripcional es la responsable de que sea la isoforma 1 del TGF- β la que se expresa como respuesta al daño (Prieto y cols., 2002). Son las diferencias en el promotor de TGF- β 1 respecto a TGF- β 2 y TGF- β 3 las que parecen ser responsables de la expresión selectiva de TGF- β 1 en procesos patológicos como la reparación de tejidos, estrés y carcinogénesis (Prieto y cols., 2002). Por ello, la mayor parte de nuestros estudios se han centrado en esta isoforma.

En nuestro estudio, el comportamiento del TGF- β 1 ha sido analizado a través de su expresión proteica (mediante técnicas inmunohistoquímicas y Western blot) y de su expresión génica.

El TGF- β 1 latente mostró su presencia en el omentum control a nivel de las membranas mesoteliales. En las adherencias de 3 días, a pesar de mantenerse los niveles proteicos, el marcaje se traslada hacia las membranas vasculares donde se mantendrá en el tejido adherencial de todos los tiempos de estudio manifestando el proceso angiogénico que se produce en el tejido adherencial. A los 7 días se produce una disminución significativa de esta forma latente, con tendencia a la recuperación posterior a los 14 y 90

días. Una vez alcanzada la fase de maduración y remodelación (14 días) se puede observar cómo esta citocina está presente en la abundante matriz fibrilar, reflejando, por tanto, la estabilidad del proceso fibrótico. A los 90 días, aparece en las escasas zonas fibrosas remanentes y a nivel de la capa media vascular.

El análisis de la concentración proteica mediante Western blot reveló diferentes bandas mediante la incubación con el anticuerpo que reconoce la forma madura del TGF- β 1. La banda correspondiente al monómero de 12.5 KDa aparecía con muy baja intensidad en algunas de las muestras siendo inexistente en el resto, incluso dentro de un mismo grupo de estudio. La forma madura del TGF- β 1 tiene una vida media de tan sólo 2 minutos (Wakefield y cols., 1990), lo que explica su baja concentración y la elevada variabilidad intragrupo encontrada. De manera que consideramos que el análisis de esta banda no proporcionaría un estudio fiable de la actividad del TGF- β 1. Se observó una banda de 50-55 KDa, así como un dímero que aparecía en forma de doblete de 110 KDa que podría corresponder al pro-TGF β o a un complejo formado entre la forma activa del TGF- β 1 y otro componente no identificado. Se observaron dos bandas de menor intensidad de pesos moleculares entre 75-90 KDa, que podrían corresponderse a la unión de la forma madura del TGF- β 1 con el receptor tipo I (53 KDa) o bien con algún otro componente.

La banda más intensa en todos los grupos aparecía a 100 KDa, que podría corresponder a la forma madura del TGF- β 1 unido a uno de sus receptores. Los resultados obtenidos para los diferentes grupos de estudio mediante el estudio de la expresión de esta banda reflejaban las observaciones realizadas mediante técnicas inmunohistoquímicas. El peso molecular de esta banda sugiere la unión de la forma madura a su receptor tipo II (70-85 KDa), siendo éste el primer paso en la formación del complejo necesario para su señalización.

La señalización por parte de la forma madura del TGF- β 1 requiere de la formación de un complejo con sus receptores. La unión del TGF- β 1 a los receptores tipo II induce la formación de un complejo con los receptores tipo I, receptor que es incapaz de unir por sí mismo al ligando. Es la quinasa del receptor tipo II la que es constitutivamente activa. Por tanto, la unión entre la forma madura del TGF- β 1 y el receptor tipo II podría considerarse como un buen indicador de la actividad biológica del TGF- β 1.

Obviamente, para poder asegurar la correspondencia de esta banda con el complejo formado entre el TGF- β 1 y el receptor tipo II se requeriría de un estudio paralelo para éste último. Sin embargo, el modelo animal elegido, el conejo, nos plantea grandes dificultades a la hora de encontrar anticuerpos específicos para él. De manera que, hasta la fecha, tan sólo se ha podido realizar esta aproximación.

El análisis de la expresión del TGF- β 1 activo mostraba ya un aumento significativo en el tejido adherencial de 3 días en relación al omentum control, que coincide con la aparición de linfocitos y macrófagos. La quimiotaxis de linfocitos y macrófagos se produce a partir del momento en que la población de células polimorfonucleares disminuye, cuando la concentración de TGF- β 1 se encuentra en torno a los femtogramos (Hernández-Pando, 2003). Este aumento en la concentración de TGF- β 1 produce, además, la activación de los monocitos. De manera que es a los 3 días post-cirugía cuando encontramos los mayores niveles de macrófagos, que se mantienen hasta los 7 días tal y como ocurre en la reparación normal (diZerega, 2000).

Entre los 3-14 días, el marcaje del TGF- β 1 activo en el tejido adherencial ya no se limita al territorio vascular, sino que aparece en zonas de mayor celularidad que presentan una matriz de tejido conectivo que se incrementa con el paso del tiempo, disminuyendo la cantidad de tejido adiposo. La aparición del tejido de componente fibroso se produce a los 7 días, coincidiendo con el aumento en la activación de la forma latente del TGF- β 1. Lo que podría indicar que la presencia de macrófagos podría estar relacionada con la evolución del tejido adherencial a través de la activación del TGF- β 1. También se han mostrado concentraciones elevadas de TGF- β 1 activo y total en el líquido peritoneal durante la primera semana tras la inducción de las adherencias (Rong y cols., 1997).

Curiosamente, las adherencias de 90 días mostraban niveles de TGF- β 1 maduro similares a las adherencias de 7 días. Si bien, a tiempos largos, el marcaje inmunohistoquímico quedaba restringido nuevamente al área vascular.

Al progresar la respuesta inflamatoria, hay una mayor cantidad de células participantes (especialmente macrófagos llegados a la zona lesionada) que constituyen otra fuente de TGF- β 1. Alcanzado así concentraciones picomolares que estimulan, a su vez, la producción de otras citocinas proinflamatorias (Hernández-Pando, 2003). Estas citocinas

participan en los procesos de movilización y desplazamiento leucocitario, pudiendo ser las responsables del incremento en el número de leucocitos observado a 7 días. De manera que la participación proinflamatoria del TGF- β 1 durante el proceso inflamatorio se considera indirecta, ya que es mediada a través de la atracción y activación de monocitos para que éstos, a su vez, generen otras citocinas que magnifiquen la respuesta inflamatoria.

La migración leucocitaria hasta el lugar del daño o infección es un proceso complejo, que está estrechamente controlado por la interacción entre las células endoteliales, los leucocitos y las quimiocinas.

En todo este proceso se hallan muy involucradas las MMPs, que influirán en la progresión de los procesos inflamatorios. Las MMPs pueden favorecer la migración leucocitaria mediante el procesamiento de las quimiocinas. Pero además pueden producir la proteólisis de citocinas, alterando su disponibilidad y actividad. Ya que, además de las MMPs, son varios los factores que pueden influir en la disponibilidad y actividad del TGF- β 1, hemos preferido centrar nuestros esfuerzos en el estudio directo de estos dos parámetros en nuestro modelo, más que en la causa que los modifica. No obstante, el papel de las MMPs es de gran importancia en la formación y desarrollo adherencial y serán objetivo de nuestras futuras investigaciones.

Nuestros resultados muestran que el pico en el nivel de expresión de la población linfocitaria ocurre a los 7 días post-cirugía, coincidiendo con el aumento en la expresión de TGF- β 1 activo. El TGF- β 1 puede seguir un mecanismo de acción autocrino (Kim y cols., 1990) o paracrino (Prieto y cols., 2002). Así, el LAP-TGF- β 1 que encontrábamos en la matriz extracelular de forma homogénea en las adherencias de 3 días (regulación paracrina) o en las células inflamatorias (regulación autocrina) se encontrará activo a 7 días. La forma activa estará disponible para ser captada por los linfocitos y células inmunes presentes a ese tiempo, ya que muestran gran cantidad de betaglicano anclado a membrana.

La señalización excesiva de TGF- β 1 en estas células ejercerá una regulación autocrina impidiendo que estas células secreten más TGF- β 1. La disminución en los niveles proteicos de TGF- β 1 podría explicar la mínima presencia linfocitaria encontrada a

14 días. Cuando el TGF- β 1 alcanza concentraciones nanomolares, actúa como una citocina antiinflamatoria (Hernández-Pando, 2003).

La presencia linfocitaria, especialmente de linfocitos T CD4+, y la forma activa del TGF- β 1 parecen encontrarse íntimamente ligados. Ya que a 90 días encontramos de nuevo un número significativo de linfocitos T CD4+, coincidiendo con un nuevo incremento en los niveles de TGF- β 1 activo. El TGF- β es capaz de aumentar las funciones efectoras y de memoria de los linfocitos T CD4+ *in vivo* (Gálvez-Gastélum, 2004). Chung y cols. (2002) indicaron el papel crucial de los linfocitos T en el desarrollo adherencial postinfecciosa y Binnebösel y cols. (2008b) mencionaban el papel de los linfocitos T en el mantenimiento de adherencias humanas, aunque en este trabajo no precisaban la subpoblación linfocitaria responsable.

Tras la fase inflamatoria, hemos observado el inicio de la fase proliferativa. Se producía la activación de fibroblastos y células mesenquimales que migraban hacia la zona de la lesión. El TGF- β 1 es capaz de alterar las propiedades adherentes de las células, así como influir en la expresión de proteínas del citoesqueleto. Puede, además, inducir la migración de fibroblastos peritoneales mediante la alteración de los niveles de expresión de subunidades específicas de integrinas, vinculinas y F-actina (Rout y cols., 2002). La mayor presencia de fibronectina, vitronectina e integrinas en los fibroblastos peritoneales podría colaborar en su migración. Así aumentará la unión de los fibroblastos a la masa proteinácea presente en el coágulo del área dañada, promoviendo el desarrollo de la adherencia (Rout y cols., 2002).

La importancia de la presencia y activación de TGF- β 1 en el proceso adhesiogénico hace que se hayan empleado anticuerpos anti-TGF- β 1 en modelos de formación adherencial en animales con resultados satisfactorios (Lucas y cols., 1996a). Sin embargo, el amplio rango de efectos que puede producir dependiendo de las proporciones relativas de sus isoformas y el papel central que juega en la cicatrización (Roberts, 1995) desaconsejaría su utilización en humanos.

A pesar de que el TGF- β 1 puede inhibir la proliferación de la mayoría de las células, también puede favorecer el crecimiento de otras. Hasta el punto de mostrar efectos diferentes sobre el peritoneo intacto y el peritoneo dañado, que podrían explicarse por su diferente acción sobre los fibroblastos y las células mesoteliales. El TGF- β 1

estimula el crecimiento, proliferación, síntesis y deposición de matriz extracelular por parte de los fibroblastos, mientras que inhibe el crecimiento y la proliferación de la mayoría de las células epiteliales (Barnard y cols., 1990; Massagué, 1990), incluyendo las células mesoteliales de la pared peritoneal. En el peritoneo dañado, los fibroblastos, macrófagos y células mesenquimales del submesotelio resultan expuestos tanto a los factores presentes en el lugar de la lesión como a los que se encuentran en el fluido peritoneal. En el peritoneo intacto, por el contrario, el líquido peritoneal tan sólo tiene acceso a las células mesoteliales. Así, la presencia de TGF- β 1 en la cavidad peritoneal puede promover la migración y proliferación de fibroblastos, así como la deposición de matriz extracelular sólo cuando se ha producido previamente una agresión que exponga los tejidos subyacentes al mesotelio. De esta manera, su presencia favorecerá la aparición y estabilización del tejido adherencial tras una lesión del peritoneo.

Las células mesenquimales son otra de las estirpes que pueden ser estimuladas por el TGF- β 1. En nuestro modelo, tras la activación del TGF- β 1 (7 días), la población de células mesenquimales abundantes en nuestro tejido omental serían células diana para su acción proliferativa. Estas células se diferenciarán hacia un fenotipo u otro en función del ambiente local y de la concentración de citocinas presentes, dando lugar a una adherencia de componente mayoritariamente adiposo o mayoritariamente fibroso.

Como ya se ha comentado, el tejido adherencial encontrado a 90 días muestra de nuevo la predominancia del componente adiposo, independientemente del tipo de adherencia del que proceda. Lo que indica que la presencia de los miofibroblastos es transitoria, así como la fibrosis producida por ellos. Este aumento en la cantidad de tejido adiposo a lo largo del tiempo también ha sido demostrado en adherencias humanas (Binnebösel y cols., 2008a).

En cuanto a la expresión del mRNA de TGF- β 1, nuestros estudios muestran un incremento en las adherencias de 3 días con respecto al omentum control. Este hecho está de acuerdo con el pico de expresión encontrado por Ghellai y cols. (2000) a los 4 días de la inducción adherencial en un modelo de peritonitis en rata. El aumento encontrado en la expresión del mRNA de TGF- β 1 en las adherencias de 3 días con respecto al omentum control se traduce en un aumento en la cantidad de proteína activa. Sin embargo, este aumento debería ser superior, teniendo en cuenta el mantenimiento de los

niveles de la forma latente. Este hecho sugiere que parte de la forma madura del TGF- β 1 no llega hasta su receptor de señalización. A 3 días, existe algún factor que une TGF- β 1 e impide su actividad biológica. El principal causante parece ser el betaglicano, cuya forma soluble muestra una elevada expresión a los 3 días del desarrollo adherencial.

Si bien el aumento en la expresión de la proteína activa en las adherencias de 3 días venía mediado por un aumento en la expresión génica del TGF- β 1, el incremento encontrado a 7 días se debe a un mayor grado de activación de la forma latente. Ya que se muestra a este tiempo una disminución en la cantidad de LAP-TGF β 1 y el mantenimiento en los niveles de expresión génica.

Los resultados de RT-PCR muestran la mayor expresión génica del TGF- β 1 a los 14 días. El ambiente proteolítico característico de los estadios más tempranos del proceso curativo o la sepsis (3-7 días) puede potenciar la liberación y activación del TGF- β 1 a partir de sus reservorios de la matriz extracelular antes de que se produzca la activación transcripcional del gen que codifica para el TGF- β 1. Posiblemente, para restablecer los niveles basales de TGF- β 1 latente, tras el elevado grado de activación de la proteína a los 7 días.

La expresión génica de TGF- β 1 a 14 días parece indicar un papel muy largo y mantenido para este factor que, como hemos visto, aparece activa en las adherencias de 90 días. La expresión de la proteína persiste a pesar de la reducción en la cantidad de RNA mensajero a ese tiempo.

BETAGLICANO

La elevada expresión de la forma soluble del betaglicano o receptor de tipo III del TGF- β en las adherencias de 3 días podría explicar por qué este tejido, a pesar de mostrar una expresión de TGF- β 1 muy superior al omentum control, no exhibe signos de fibrosis ni el grado de neoangiogénesis que empieza a visualizarse a partir de los 7 días. Así, el betaglicano soluble presente en el suero en el omentum nativo y en las adherencias de 3 días podría constituir un mecanismo de defensa ante la fibrosis de este tejido.

Por su parte, el tejido adherencial de 7 días representa un punto de inflexión en la composición, morfología y comportamiento del tejido implicado, mostrando un grado de estabilización que lo señalan como un momento desaconsejable para la realización de la

resección adherencial. A este tiempo encontrábamos la máxima expresión para su forma anclada a membrana. El hecho de que la máxima expresión de esta forma del betaglicano se produzca en el mismo momento que la máxima expresión de la forma activa del TGF- β 1, es otro punto que apoya nuestra suposición de que la banda encontrada a 100 KDa para la forma activa del TGF- β 1 corresponde a la unión de éste con su receptor tipo II.

Hemos demostrado, además, su presencia en células de tipo fibroblástico/miofibroblástico, además de en células inflamatorias, a ese tiempo. La sobreexpresión del receptor tipo III por parte de las células que componen las adherencias de 7 días explicaría el depósito de proteínas de matriz que comienza a observarse a partir de este momento. El estudio de la expresión de los colágenos tipo I y tipo III, ya sea mediante inmunohistoquímica, RT-PCR o tinción con rojo Sirio, mostraba un aumento en la cantidad de colágeno tipo III en el tejido adherencial a los 7 días, mientras que la sobreproducción de colágeno tipo I se encontraba a partir de ese momento (14 días), conduciendo a la aparición de fibrosis.

TGF- β 3

El TGF- β 3 puede mostrar efectos antagonistas a las isoformas TGF- β 1 y TGF- β 2, inhibiendo la cicatrización cutánea mediante la disminución de la presencia macrofágica, de fibronectina y la deposición de los colágenos tipo I y tipo III en los estadios de la cicatrización evitando, así, la fibrosis (Shah y cols., 1995). Además, un ambiente con un ratio elevado de TGF- β 3/ TGF- β 1 y TGF- β 3/ TGF- β 2 puede mantener unos niveles bajos de PAI-1, factor involucrado en la formación adherencial y la fibrosis (Li y cols., 2006).

No obstante, algunos autores muestran un papel pro fibrótico del TGF- β 3, favoreciendo la formación de adherencias (Gorvy y cols., 2005). El TGF- β 3 es un agente mitogénico para los fibroblastos, por lo que su presencia podría favorecer la consolidación de una adherencia fibrinosa. Lo que sugiere que los elevados niveles de este factor encontrados en el tejido adherencial de 7 días contribuirían a la evolución de la adherencia inicial hacia un tejido permanente. Sin embargo, nuestras observaciones no relacionan la presencia de TGF- β 3 con la aparición de fibrosis. Al contrario, este factor se presenta en aquellas zonas que se mantienen íntegras y las zonas de remodelación tisular adiposa, normalmente en las cercanías de los GO. Es importante resaltar que la fibrosis

encontrada en algunas de las adherencias en nuestro modelo es un proceso mediado por miofibroblastos y no por fibroblastos, siendo estos últimos muy minoritarios.

El TGF- β 3 presenta también un efecto antiinflamatorio, lo que podría explicar su presencia en el interior de los GO que se mantienen intactos inmersos en tejido adiposo y la disminución en la respuesta inflamatoria a partir del momento de máxima expresión de este factor (7 días).

En un principio, podría parecer sorprendente que las adherencias de 90 días mantengan una morfología adiposa a pesar de los elevados niveles de TGF- β 1 mostrados mediante Western blot. Sin embargo, este marcaje se presentaba a nivel vascular y no de la matriz extracelular. Además, las adherencias de 90 días mostraban una cantidad elevada de TGF- β 3, que podría tener un papel anti-fibrótico; y niveles elevados de betaglicano soluble, impidiendo la unión del TGF- β 1 a sus receptores de señalización y evitando así su actividad biológica.

Otro hecho curioso podría ser la presencia de la subpoblación de linfocitos T CD4⁺ encontrados de nuevo a los 90 días, momento en el que apenas se observan linfocitos T CD8⁺ o linfocitos B activados. Sin embargo, también en este hecho parece jugar un papel importante la presencia de TGF- β 3. Shah y Qiao (Shah y Qiao, 2008) demostraron cómo las células B en reposo eran capaces de expandir una población de células T reguladoras (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺). Para ello, requieren de la presencia de TGF- β 3, factor que ellas mismas son capaces de producir mientras no se activen. Tras su activación, las células B van a reducir la expresión de TGF- β 3, reduciendo su capacidad para expandir a las células T reguladoras e incrementando la tasa de mortalidad de éstas (Shah y Qiao, 2008). Lo que justificaría la drástica caída en el número de células T CD4⁺ a 14 días. Las células T reguladoras tienen un papel crítico en el mantenimiento de la tolerancia y la prevención de la autoinmunidad, lo que podría explicar la presencia de linfocitos T CD4⁺ en las adherencias de 90 días. Ya que éstas se han formado como respuesta a la interposición de un biomaterial que resulta extraño en la cavidad peritoneal.

Los ensayos inmunohistoquímicos realizados mostraron que la presencia de TGF- β 3 en el omentum normal se encuentra mayoritariamente en el suero, y no a nivel celular, mientras que en las adherencias encontramos esta citocina expresada, principalmente, por células presentes en los GO o con morfología de linfocito y con

localización característica de célula inflamatoria. Que podrían corresponderse con linfocitos de tipo B en estado de reposo, ya que no resultan positivas para el anticuerpo específico de célula B de conejo y otros autores (Shah y Qiao, 2008) han mostrado la expresión de TGF- β 3 por parte de esta subpoblación. La presencia de progenitores de células B en el omentum adulto ha sido mostrada por otros autores (Pinho y cols., 2005).

El estudio del tejido omental activado por la presencia de un biomaterial, a pesar de no encontrarse involucrado en la formación adherencial, nos da una idea de la sensibilidad de este tejido en cuanto al ambiente químico en el cual está inmerso. Ante un estímulo, el omentum es capaz de reaccionar conformando un tejido proliferativo, y dando lugar a una gran respuesta inmune. La transformación adipo-fibrosa de las zonas próximas a los GO nos aproxima a la importancia de estas unidades inmunofuncionales presentes en el tejido omental. La presencia de células inflamatorias e inmunes confirma la sensibilidad de todo el omentum y no sólo del efecto local que podría tener la presencia de un biomaterial.

La distribución temporal y espacial, así como el nivel de expresión del TGF- β 3 en el tejido adherencial, podría explicar el perfil encontrado para las células T CD4+. Se encuentra una escasa presencia a los 3 días, mostrando la máxima presencia a los 7 días, y volviendo a disminuir a los 14 días. La presencia de TGF- β 3 en las GO podría ser un indicativo del mantenimiento de estas estructuras como unidades o islotes de células inmunes y células proliferantes de naturaleza mesenquimatosa, inhibiendo la cicatrización y el desarrollo de un proceso fibrótico (Shah y cols., 1995; O'Kane y Ferguson, 1997). Sería un elemento que contrarrestaría la acción de todos los factores estimulantes de la diferenciación y proliferación celular inducidos por la presencia de células blancas y otras células activas en la producción de citocinas proinflamatorias, contribuyendo a mantener el estado inmaduro y con potencial proliferante en los GO en un entorno no fibrótico que permitiera la salida de sus células inmunes ante una lesión.

El efecto antifibrótico del TGF- β 3, explica la ausencia tanto de este factor como de linfocitos en aquellas áreas tisulares donde se desarrollan los procesos fibróticos. A diferencia de lo encontrado por otros autores (Chegini y cols., 1994a), que mostraban niveles elevados de todas las isoformas del TGF- β en las adherencias fibrosas.

De manera que el TGF- β 3 parece tener una repercusión en la génesis adherencial y en el tipo de adherencia formado mucho mayor a lo mostrado por otros autores (Chegini y cols., 2001), al menos, en el caso de adherencias omentales.

VEGF

Durante el proceso de cicatrización, uno de los factores fundamentales y necesarios para lograr la reparación pretendida por este proceso es la revascularización del tejido cicatricial o angiogénesis. Cualquier tejido que no esté suficientemente vascularizado, tendrá que desarrollar recursos adicionales para lograr un buen aporte vascular. En este proceso, el VEGF juega un papel fundamental.

Tal es el caso que hemos encontrado en la formación adherencial omental. La presencia del biomaterial en la cavidad peritoneal provoca la aparición de microtraumas tanto sobre la serosa visceral (en nuestro caso, omental) como sobre la serosa del peritoneo parietal sobre el que se encuentra la malla. Estas lesiones producen una situación de isquemia en estos tejidos, especialmente en las zonas de los puntos de sutura que anclan la malla a la pared abdominal.

Hemos encontrado una elevada expresión de VEGF tanto a nivel génico como proteico en el omentum control. Este hecho es indicativo de la elevada capacidad angiogénica de este tejido.

En nuestro estudio, la expresión inmunohistoquímica de VEGF fue específica para los adipocitos y el lecho endotelial de este tejido. La elevada producción de VEGF por parte de los adipocitos omentales también ha sido por mostrada por otros autores (Masuda y cols, 2004). Cuando se produce una agresión al omentum, el VEGF puede favorecer el depósito de fibrina necesario para la subsiguiente migración y proliferación. Constituyendo, de este modo, el primer eslabón para el asentamiento del tejido adherencial y de las células endoteliales durante el proceso angiogénico.

En nuestro trabajo, la expresión del VEGF se sigue encontrando a nivel endotelial en el tejido adherencial, mostrando la aparición de un gran número de vasos de menor tamaño a los pre-existentes en el omentum. En las adherencias de 3 días, este aumento se produce sobretodo en el submesotelio engrosado.

A los 7 días, la expresión de VEGF recupera los niveles del omentum control y ya no se limita solamente al endotelio vascular, sino que se observa en su forma soluble

(ligado a heparina) en la matriz extracelular. Así, modula su actividad (Ito y Claesson-Welsh, 1999). A este tiempo, se observó la presencia de este factor por parte de células inflamatorias que se corresponderían con macrófagos, mastocitos y linfocitos. El aumento en los niveles de VEGF a 7 días podría estar en relación con la mayor presencia de células linfocitarias en ese momento, ya que el VEGF incrementa la permeabilidad vascular esencial para la llegada de la respuesta inflamatoria y los linfocitos son capaces de secretar VEGF.

La aparición de VEGF en aquellas zonas que muestran la regeneración del tejido adiposo pone de manifiesto su papel en los procesos reparativos tisulares. Es conocida su función tanto en la respuesta inflamatoria temprana como en la remodelación tisular a través de la función de los fibroblastos (Wiczak y cols., 1998; Diamond y cols., 2005). Y, a la vista de nuestros resultados, puede mediar la reparación tisular no sólo a partir de los fibroblastos, sino también a partir de otras estirpes celulares como las células mesenquimales omentales.

Zareie y cols. (Zareie y cols., 2006) mostraron que la activación del endotelio omental promueve la migración de los mastocitos, entre otros leucocitos. Tras su migración, estos se acumulan en los GO o permanecen alrededor de los vasos sanguíneos donde se degranularán promoviendo la formación de nuevos vasos y/o fibrosis mediante la secreción de VEGF o la estimulación de la llegada de células inflamatorias que lo produzcan (Cahill y cols., 2006). Zareie y cols. (Zareie y cols., 2006) demostraron que los mastocitos son capaces de inducir la remodelación tisular omental. En nuestro estudio, hemos observado la presencia de células mastocíticas en la región perivascular del tejido adherencial a partir de la cual se produce la remodelación del tejido adiposo omental, pero no se observó en el interior de los GO. Esto podría mostrar que la degranulación mastocitaria en los GO se produce previamente a nuestro primer tiempo de estudio (3 días).

A los 14 días, nos encontramos un significativo descenso en la presencia de VEGF, de nuevo limitado al entorno vascular. La evolución en la expresión de esta citocina refleja el proceso intenso de angiogénesis que ocurre en la formación del tejido adherencial (3 y 7 días). Sin embargo, a los 14 días, el aparente descenso en el número de vasos puede ser debido al incremento del tejido adherencial en torno a los vasos ya formados.

En cuanto a su expresión génica, resulta interesante destacar los elevados niveles de mRNA de VEGF presentes en el omentum control. Rout y cols. (2000) demostraron que una agresión tisular aumenta la expresión de mRNA del VEGF de manera significativa en las 6 y 12 primeras horas. Sin embargo, esto parece no coincidir con lo que hemos encontrado. En nuestro estudio, se produce una disminución en la cantidad relativa de mRNA de VEGF en el tejido adherencial en los tiempos más tempranos, que no restablece los niveles génicos iniciales hasta los 14 días. Esta diferencia podría venir explicada por el diferente modelo adhesiogénico empleado y el tejido estudiado. Estos autores analizaron adherencias uterinas, en comparación con tejido uterino normal. El omentum es un tejido con una expresión génica de VEGF muy elevada. Algunos autores han mostrado concentraciones de VEGF en el omentum entre 10 y 100 veces superiores a los niveles encontrados en otros tejidos adultos (Zhang y cols., 1997; Singh y cols., 2004). Por eso, no resulta raro que encontremos una expresión inferior en el tejido adherencial de los primeros tiempos en comparación con nuestro tejido control. Y, por otro lado, hemos estudiado tiempos más largos. De manera que la situación previa a los 3 días post-cirugía no se recoge en nuestro estudio y ellos, por su parte, no recogen la situación a los 14 días, momento en el que encontramos el restablecimiento de los niveles génicos. El aumento que hemos observado entre los 7 y 14 días podría venir inducido por las células de aquellas zonas más fibróticas que muestran escasa vascularización y presencia miofibroblástica y que parecen venir influidas por una situación de hipoxia.

EFFECTO DE LA HIPOXIA EN LA FORMACIÓN ADHERENCIAL

Uno de los factores asociados a la formación de adherencias postquirúrgicas es la isquemia. Esta disminución del riego sanguíneo, ya sea transitoria o permanente, conlleva la disminución del aporte de oxígeno al tejido biológico (hipoxia). Este es un hecho común que se encuentra, en mayor o menor medida, durante un procedimiento quirúrgico.

En nuestro modelo, la interposición de un biomaterial es un factor desencadenante de la hipoxia. Especialmente en aquellas zonas donde se encuentran los puntos de sutura. La tensión producida por estos produce cambios microcirculatorios que conducen a isquemia local. De hecho, los puntos de sutura empleados en el implante de un biomaterial o bien en las incisiones que nos permiten el acceso a las cavidades

corporales durante la cirugía son los lugares donde más frecuentemente encontramos formación adherencial.

La hipoxia es un factor traumático capaz de perturbar el equilibrio entre la coagulación y la fibrinólisis en la cavidad peritoneal, favoreciendo de esta manera la formación de adherencias. Pero esta no es la única vía a través de la cual la hipoxia puede inducir el desarrollo adherencial. Se ha demostrado que la hipoxia es capaz de inducir la expresión de TGF- β 1 en diversas estirpes celulares: células endoteliales sanguíneas (Zhang y cols., 2003), células mesoteliales (Saed y cols., 2000) y fibroblastos peritoneales (Saed y cols., 2002). Ejerciendo un importante papel en la adhesión celular a la matriz extracelular y la deposición de algunos de sus componentes. Como es el caso del colágeno tipo I (Saed y Diamond, 2002), cuya síntesis depende de la disponibilidad de oxígeno molecular.

En nuestro modelo encontrábamos un aumento tisular de la cantidad de TGF- β 1 activo así como de la expresión del gen cuando se producía la formación de una adherencia, en comparación con el tejido control. Este aumento puede relacionarse, entre otros factores, con la hipoxia producida en los tejidos dañados como consecuencia del implante del biomaterial. A tiempos posteriores, el tejido adherencial seguiría expuesto a una situación de hipoxia, especialmente en las áreas de cicatrización fibrótica, donde la hiperplasia celular y la excesiva secreción de matriz extracelular conformarían áreas de difícil asentamiento vascular, creando nuevas zonas con un escaso aporte de oxígeno.

Se ha demostrado que el restablecimiento del aporte de oxígeno (normoxia) tras la hipoxia no revierte la estimulación de la expresión de TGF- β 1 ni del colágeno tipo I (Saed y Diamond, 2002). Este hecho podría explicar, en parte, la observación clínica de que la reformación adherencial es más difícil de prevenir que la formación adherencial *de novo*. Y apoya nuestra hipótesis de que una vez alcanzado un cierto nivel de TGF- β 1 activo y el comienzo de la deposición de colágeno en el tejido adherencial (en nuestro modelo, a los 7 días), no es recomendable realizar la adhesiolisis. Ya que supondría una elevada probabilidad de reformación adherencial.

EL MIOFIBROBLASTO Y LA FIBROSIS EN LAS ADHERENCIAS

Uno de los tipos celulares que componen el tejido adherencial son los miofibroblastos. El miofibroblasto ha sido descrito como un fibroblasto activado con

características intermedias entre los fibroblastos y las células de músculo liso, incluyendo la expresión de α -actina de músculo liso (Gabbiani, 1994; Powell, 2000). La expresión de esta proteína por parte de los miofibroblastos, junto con la morfología fusiforme que muestran, nos ha permitido observar su presencia en el tejido adherencial a partir de los 7 días y, especialmente, en aquellas zonas con mayor depósito de colágeno.

El miofibroblasto está presente en cualquier proceso cicatricial y, una vez resuelto éste, desaparece por apoptosis. Sin embargo, en situaciones patológicas, como puede ser la fibrosis, la diferenciación miofibroblástica persiste y produce una cicatrización excesiva. La formación de adherencias postoperatorias podría considerarse como un proceso patológico. Y los miofibroblastos son una de las estirpes celulares responsables de su formación, ya que son una de las principales fuentes de proteínas de la matriz extracelular, así como de factores de crecimiento fibrogénicos como el TGF- β 1. Esta citocina es un inductor directo de la diferenciación miofibroblástica, a través del control de la expresión de α -actina de músculo liso (Desmoulière y cols., 1993).

La fibrosis producida por una sobreexpresión de TGF- β 1 también ha sido reflejada en otros desórdenes fibróticos (Eddy, 1996; Lawrence, 1996). El desarrollo adherencial está asociado con una deficiencia en la eliminación de los fibroblastos que sobreexpresan el receptor del TGF- β durante la remodelación del tejido de granulación (Saed y cols., 2002). Esto conduce a una retroalimentación autocrina persistente que resulta en una sobreproducción de proteínas de matriz y, por consiguiente, el desarrollo de una adherencia.

Los miofibroblastos pueden generarse por diferenciación de los fibroblastos en respuesta a una lesión o a una situación de hipoxia (Desmoulière y Gabbiani, 1995; Powell y cols., 1999). Aunque también es posible la diferenciación de los miofibroblastos a partir de células madre embrionarias en presencia de PDGF y el factor de células totipotenciales (SCF) (Powell y cols., 1999).

El elevado porcentaje de células que expresaban marcadores de célula madre totipotencial (SSEA-4 y Oct-3/4) en nuestros cultivos y la coexpresión con la α -actina de músculo liso en las células procedentes de adherencias fibrosas sugiere la diferenciación miofibroblástica a partir de las células indiferenciadas que se encuentran en el omentum.

La capacidad de secreción de TGF- β 1 por parte de los miofibroblastos se debe al efecto que ejerce su contracción en la liberación y activación del TGF- β 1 a partir de los depósitos de su forma latente ya existentes en la matriz extracelular (Wipff y cols., 2007). Los estudios que hemos llevado a cabo han mostrado cómo una mayor presencia de células miofibroblásticas en el tejido confiere a éste mayor contractilidad y deposición de colágeno, dando lugar a lo que hemos denominado como adherencia de tipo fibroso. Hemos encontrado gran cantidad de TGF- β 1 latente almacenado en la matriz extracelular de las adherencias de 14 días, concretamente en zonas de composición miofibroblástica. La contracción de estas células podría conducir a una liberación mantenida de TGF- β 1, lo que conduciría a un proceso fibrótico. El desarrollo de fibrosis ha sido relacionado con un exceso de actividad del TGF- β 1 tanto en humanos como en diferentes modelos animales (Cromack y cols., 1987; Ketteler y cols., 1994; Border y Noble, 1994).

Otro de los factores implicados en la diferenciación hacia la estirpe miofibroblástica es el estrés mecánico. Éste favorecería la contracción miofibroblástica, aumentando la tasa de liberación de TGF- β 1. Por tanto, es otro factor a tener en cuenta en la conversión del omentum hacia un fenotipo tisular u otro en la formación adherencial.

Tras la lesión del omentum que da lugar a la formación adherencial, se ha observado la formación de un tejido sobre la zona dañada, cubriéndola y aislándola del entorno, de composición similar al tejido de granulación formado en lesiones cutáneas. El tejido de granulación encontrado en las adherencias durante la primera semana (fase de proliferación) se compone de nuevos vasos sanguíneos, fibroblastos, células inflamatorias, células endoteliales, células en diferenciación hacia miofibroblastos y células indiferenciadas. La composición de la matriz extracelular en este momento es transitoria y compuesta en su mayoría por componentes no fibrilares como la fibronectina, el colágeno, y los proteoglicanos y glicosaminoglicanos como el ácido hialurónico, proporcionando una matriz altamente hidratada que facilita la migración celular y que será reemplazada por otra similar a la que se encuentra en tejidos no dañados. Los fibroblastos y miofibroblastos son las células responsables de generar el colágeno en la cicatriz, importante para aumentar la resistencia de la herida. De otra manera, lo único que mantendría la herida cerrada sería el coágulo de fibrina, que no proporcionaría demasiada resistencia frente a heridas traumáticas. Esta deposición de

colágeno que en heridas cutáneas resulta de indudable importancia, en las lesiones producidas en la cavidad peritoneal conduce a la formación y estabilización adherencial.

La resección adherencial debe realizarse antes de la consolidación del tejido de granulación, previamente a la formación de nuevos vasos sanguíneos entre las superficies enfrentadas y la deposición de componentes de la matriz extracelular que funcionen como nexo de unión entre las dos regiones. En este punto, estamos en desacuerdo con Chegini (1997), según el cual las medidas preventivas deben realizarse entre los cinco y siete días después de la lesión, ya que es el período crítico de la reepitelización y los niveles de los factores de crecimiento se encuentran elevados. Para nosotros, cualquier agresión que se produzca al eliminar las adherencias, en un ambiente rico en factores de crecimiento activados, induciría la reformación de estas.

A la vista de los resultados obtenidos, el tejido adherencial de tres días parece mostrar una situación adecuada para ser sometido a la resección adherencial. En este momento ya se ha iniciado la respuesta inmunológica por parte del tejido, la proliferación celular y regeneración tisular. La red de fibrina ya le ha devuelto la integridad al tejido dañado y sobre ella han migrado las células que cubrirán y repararán la superficie dañada. Pero aún no ha comenzado la deposición de matriz extracelular. Los niveles de colágeno I y III obtenidos para este tejido mediante inmunohistoquímica, tinción con rojo Sirio o la expresión génica mediante RT-PCR muestran un ligero incremento no significativo con respecto al omentum control. A los tres días aún no se encuentra la presencia de factores de crecimiento que proporciona un ambiente propicio para la diferenciación.

En nuestro estudio, la fase de maduración y remodelación en el tejido adherencial aparecía en las adherencias de 14 días. Se observaba la degradación de colágeno de tipo III y una disminución en la expresión del gen, junto con el depósito de colágeno de tipo I y aumento sustancial de su expresión génica. Las fibras de colágeno que previamente se encontraban desorganizadas son, a partir de este momento, interconectadas, ordenadas y alineadas a lo largo de líneas de tensión. Así, se incrementa la resistencia a la tracción del tejido a la vez que los vasos sanguíneos que ya no son necesarios acaban colapsando. La menor presencia de vasos sanguíneos en las zonas fibrosas explicaría las observaciones de Ellis (1962) y diZerega (1994), que definen las adherencias como tejido cicatrizal avascular en forma de bandas fibrosas. Sin embargo, hemos demostrado que este tejido es transitorio y minoritario a tiempos largos, siendo las adherencias estructuras altamente

celulares y bien vascularizadas como describen Epstein y cols. (2006), Herrick y cols. (2000) y Binnebösel y cols. (2008a).

EVOLUCIÓN DEL TEJIDO ADHERENCIAL

Tras la discusión realizada sobre los diferentes factores que afectan la formación y el desarrollo adherencial y teniendo en cuenta el conjunto de los resultados obtenidos, nos encontramos en situación de comentar el proceso evolutivo general que sufre el tejido omental cuando conforma una adherencia.

La extravasación plasmática observada en el omentum activado conduce a la presencia de fibrina en el exterior de los vasos así como a la migración leucocitaria hacia esas zonas. La fibrina extravasada forma un coágulo adherente que en contacto con una superficie opuesta podrá desarrollar una adherencia. La presencia de linfocitos en ese coágulo proporciona, además, una respuesta inmune de rápida actuación en caso de agresión. Se ha observado la secreción de VEGF en las áreas de remodelación tisular del omentum activado así como su presencia en los hematíes presentes en las zonas de extravasación sanguínea en el tejido adherencial. Lo que explica el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a medida que la matriz de fibrina se organiza. Singh y cols. (2008) mostraron una elevada síntesis de VEGF *in vitro* por parte de las células estromales del omentum activado una semana después de la inyección intraperitoneal de partículas de polidextrano. Nosotros ya habíamos mostrado anteriormente cómo la malla de polipropileno induce un intenso grado de angiogénesis en el tejido de integración (Bellón y cols., 1995).

La migración y expansión de los macrófagos activados desde los glomérulos omentales hacia el resto del tejido coincide, en un primer momento, con las zonas de proliferación del tejido adiposo circundante.

Los GO presentan células indiferenciadas o células mesenquimales que, tras su activación, son capaces de diferenciarse a adipocitos o bien a células fibroblastoides que podrán diferenciarse, a su vez, a miofibroblastos. Y sintetizar una red colágena. Los adipocitos generados pueden madurar hasta dar lugar a tejido adiposo maduro o bien el tejido adiposo puede ser colonizado por células miofibroblásticas que den lugar a tejido conectivo denso con componente fibroso.

El tejido adiposo tiene la capacidad para expandirse o contraerse, según la disponibilidad de nutrientes. Para lo que requiere un ajuste del suministro de sangre y del tejido conjuntivo o estroma. Hemos podido constatar este aumento de volumen mediante el estudio laparoscópico secuencial. Algunos autores han mostrado un aumento de 20 veces en la masa y el tamaño del omentum mediante la producción de un neot Tejido compuesto principalmente por células estromales, células intersticiales y vasos sanguíneos (Singh y cols., 2008). De manera que, tras su activación, el omentum sufre un aumento del componente estromal en detrimento del tejido adiposo, tal y como hemos visto en el tejido omental que forma parte de las adherencias. Esta expansión se produce a partir de las células de los glomérulos omentales, que se comportarían como centros organizadores de diferenciación tisular.

El estudio evolutivo de la estructura y composición histológica del tejido adherencial ha mostrado que la fibrosis no aparece hasta después de los 3 días, así como la respuesta proliferativa de todo el tejido. Se observa un engrosamiento de la capa más externa del tejido, aquella en contacto con la cavidad peritoneal. Sobre la cubierta mesotelial se observan agregados de células blancas que producen la activación del mesotelio. Las células inflamatorias contenidas en los glomérulos omentales del submesotelio comienzan su migración, colonizando el tejido adiposo. A excepción de la capa más externa del tejido, el aspecto de las adherencias de 3 días es muy similar al mostrado por el omentum control.

Parece que, en general, la llegada de células blancas al tejido adiposo omental, ya sea mediante extravasación de los vasos internos del tejido o a través del líquido de la cavidad peritoneal, dirige la transformación del tejido. Podrían ser las responsables de la activación de las células madre mesenquimales presentes en el tejido adiposo y en los GO. Estas células madre del tejido adiposo presentan capacidad para generar una señal y vascularizar nuevos tejidos, además de controlar procesos inflamatorios inmunológicos, y de sufrir, con el paso del tiempo, dos evoluciones diferentes: la maduración hasta conseguir un tejido adiposo maduro o la colonización por parte de células miofibroblásticas productoras de colágeno.

A partir de los 7 días post-cirugía, empezamos a observar una gran proliferación de células inflamatorias por toda la superficie tisular. Y encontramos dos comportamientos diferentes en las zonas invadidas por ellas. Por un lado, encontramos áreas en las que se

aprecia la aparición de una gran cantidad de microvasos inmersos en una matriz extracelular aún con ausencia de componentes fibrilares. Estas zonas han mostrado ser extremadamente reactivas para el TGF- β 1. No se observa la cercanía de los vasos preexistentes en el tejido omental, sugiriendo que este tejido era deficiente en oxígeno, lo que explicaría la elevada producción de TGF- β 1 y la ausencia de TGF- β 3. El VEGF colocalizaba con el TGF- β 1 presente en los microvasos.

Este tejido evoluciona, a 14 días, hacia un tejido fibrótico en aquellas adherencias de naturaleza fibrosa con elevada expresión de colágeno tipo I. La deposición de colágeno, la presencia de zonas fibróticas que reemplazan el tejido adiposo omental y el incremento de la celularidad también ha sido observado entre los 7 y los 14 días post-cirugía en ratones (Wilkosz y cols., 2008).

En otras zonas, en general cercanas a grandes vasos, se observa la aparición de nuevo tejido adiposo a partir de preadipocitos. Estas zonas se mostraron completamente negativas para el TGF- β 1, mientras que una cantidad considerable de las células inflamatorias allí presentes mostraban positividad para el TGF- β 3 y el VEGF. A 14 días seguimos encontrando la proliferación de células de aspecto mesenquimal y preadipocitos hacia adipocitos.

El hecho de que parte de las células inflamatorias presentes en este último tipo adherencial expresen TGF- β 3 y no las células presentes en el tejido reactivo para TGF- β 1 manifiesta el efecto antagónico de estas dos citocinas. El primer tipo de tejido adherencial debe su evolución a la gran cantidad de TGF- β 1, que supondrá la diferenciación de fibroblastos y células indiferenciadas hacia miofibroblastos. Elevados niveles de TGF- β 1 pueden, además, producir cambios en el grado de activación de las células inflamatorias. Por lo que podría haber producido la diferenciación de las células B en reposo, haciendo que dejaran de secretar TGF- β 3. Las adherencias de tipo adiposo, por su parte, deben su morfología al efecto antifibrótico del TGF- β 3. Las células B en reposo que lo expresan producen la expansión de las células T reguladoras, que podrían colaborar en la expansión del tejido adiposo.

Hasta los 14 días, la situación encontrada en el tejido adherencial de evolución fibrosa reproduce la evolución típica del proceso de curación de una herida cutánea. En contraste, las adherencias de componente adiposo simulan un proceso de regeneración tisular, más que de reparación.

Una diferencia importante entre la formación y evolución adherencial y la cicatrización de heridas cutáneas es que esta última acaba disminuyendo su vascularización en la fase de diferenciación y remodelación, para dar lugar a la formación de una cicatriz fibrosa acelular, a diferencia de lo observado en las adherencias de 90 días. Si bien el tejido de las adherencias fibrosas comienza a disminuir su nivel de vascularización y de proliferación celular a partir de los 14 días, a los 90 días son indistinguibles de las adherencias de naturaleza adiposa, mostrando de nuevo una morfología similar al tejido omental a partir del cual se originaron. En este punto, estamos en desacuerdo con Bakkum y Trimbo-Kemper (Bakkum y Trimbo-Kemper, 1995), que sostienen que una vez resuelta la fase de respuesta inflamatoria (alrededor de ocho días después de la agresión), el tejido adherencial permanece en un estado quiescente en el que apenas modifica sus características.

Según nuestro modelo, no podemos determinar de cuánto tiempo requiere el tejido adherencial para volver a mostrar su composición inicial. Wilkosz y cols. (2008) mostraron un grado significativo de resolución del daño tisular junto con una disminución en la celularidad y componente fibroso a los 28 días post-cirugía. La reversibilidad del fenotipo fibroso de manera tan temprana podría deberse, probablemente, al modelo adhesiogénico utilizado y a la baja antigenicidad del material de sutura empleado. Sin embargo, existen diferencias importantes entre su modelo experimental y el empleado por nosotros en esta memoria. Otros autores que han empleado mallas seguían encontrando bandas fibrosas en el tejido adherencial a los 28 días post-cirugía (Baptista y cols., 2000), mientras que otros grupos (Bright y cols., 1982) mostraban fibrosis incluso a los 90 días post-cirugía. Posiblemente, debido a una reacción crónica a cuerpo extraño.

En nuestro modelo, a los 90 días post-cirugía, encontramos la predominancia del tejido adiposo. No obstante, un estudio más allá de su morfología histológica nos desvelaba diferencias con respecto al omentum control. Encontramos un gran número de microvasos con expresión de TGF- β 1 a nivel endotelial y presencia de células positivas para TGF- β 3 en los glomérulos omentales. Además de una discreta presencia de macrófagos y linfocitos T CD4+, aunque este último hecho podría explicarse como una respuesta a la tolerancia y autoinmunidad debidas a la presencia del biomaterial. La persistencia de células macrofágicas a 90 días ya había sido demostrada por nuestro grupo

en el tejido de integración de una malla de polipropileno (Bellón y cols., 1994), mostrando una disminución progresiva desde los 14 a los 90 días post-implante.

Otros autores (Hobson y cols., 2003) también han mostrado cómo los niveles de TGF- β 1 tanto en el tejido adherencial como en el suero del paciente permanecían elevados mucho tiempo después de la agresión, una vez que el tejido ya se había organizado y el proceso cicatrizal había concluido. El aumento en los niveles de TGF- β 1 en suero podría indicar una mayor predisposición de los pacientes sometidos a cirugía abdominal previa al desarrollo de adherencias más severas (Hobson y cols., 2003). En nuestra opinión, también los niveles de TGF- β 1 en tejido podrían indicar el momento más adecuado para la resección del tejido adherencial. En este sentido, la realización de la adhesiolisis en un momento previo a la activación del TGF- β 1 latente presente en el tejido ha mostrado resultados satisfactorios.

LAS CÉLULAS MESENQUIMALES OMENTALES. SU PAPEL EN LA FORMACIÓN ADHERENCIAL.

El aislamiento y expansión de las células procedentes del omentum y del tejido adherencial ha mostrado la existencia de células mesenquimales. Éstas podrían corresponder a las células que mostraban marcadores de indiferenciación (Oct-3/4 y Nanog) *in vivo* y que se encontraban localizadas, mayoritariamente, en las zonas mesoteliales y en relación con las GO. Según los resultados obtenidos, el omentum parece contener células multipotentes estromales similares a las que otros autores aíslan a partir de lipoaspirados de grasa subcutánea (Zuk y cols., 2002).

Nuestras células han mostrado, *in vitro*, que poseen características típicas de células multipotentes, como son la capacidad de autorrenovación y la viabilidad a largo plazo. Los estudios realizados sobre las células procedentes del tejido adherencial omental parecen mostrar su potencial de diferenciación *in vivo* hacia diferentes estirpes, aunque restringidas a ciertas líneas. La expresión de marcadores de células pluripotentes en células estromales de omentum activado también ha sido recientemente mostrada por otros autores (Singh y cols., 2008). Y podría explicar la capacidad reparativa del omentum en tejidos dañados, ya que la presencia de células multipotentes le proporcionaría la plasticidad y capacidad de expansión y de formación de tejido complejo irrigado.

La expansión de la población adherencial ha permitido constatar que la población omental mesenquimal es altamente sensible a los factores ambientales locales. Los estudios realizados aportan algunos hechos que implican a esta estirpe celular en la formación adherencial. Pero no sólo eso, sino que dependiendo del ambiente al que se encuentren sometidas se muestran capaces de generar dos tipos de tejido diferentes (Gómez-Gil y cols., 2009).

Una de las características de las células mesenquimales es su capacidad de proliferación cuando es adecuadamente estimulada. Las células obtenidas a partir de las adherencias, mostraron una tasa de proliferación estadísticamente significativa en comparación con las células del omentum control.

El análisis del recuento celular nos permitió observar diferencias en cuanto al comportamiento de las poblaciones celulares dependiendo del tipo de adherencia del que habían sido obtenidas. Encontramos que en la población procedente de adherencias de tipo fibroso, la proliferación celular es superior a la población procedente de adherencias de tipo adiposo hasta el cuarto día de estudio, mientras que la población adiposa mantiene una tasa moderada hasta este momento, para alcanzar a 8 días unos niveles claramente significativos con respecto a las otras dos poblaciones estudiadas.

El comportamiento proliferativo de las poblaciones celulares procedentes de tejido adherencial podría correlacionarse con el ambiente previo en el cual estas células se encontraban antes de su aislamiento. Un parámetro que parece de especial importancia es el ratio $TGF-\beta 1/TGF-\beta 3$. Como hemos observado mediante las técnicas inmunohistoquímicas, la población adherencial fibrosa se halla inmersa en un entorno tisular con elevada expresión de $TGF-\beta 1$. Este estímulo se traduce en un cultivo celular con un alto índice de proliferación durante los primeros días, mostrando una ralentización a partir del cuarto día. Esta disminución en su capacidad proliferativa podría ser debida a la ausencia del estímulo y pérdida de su efecto *in vitro*. Así, se muestra el efecto dual del $TGF-\beta 1$. Por un lado, estimula la proliferación celular, lo que explica la mayor capacidad proliferativa de esta población durante los primeros momentos en cultivo. Y, por otro lado, favorece la diferenciación celular hacia la estirpe miofibroblástica. Como hemos visto mediante el estudio del tejido, estas células conducen al estado fibrótico característico de ambientes con elevada y prolongada

presencia de TGF- β 1. Cuando las células se encuentran en proceso de diferenciación, disminuyen su poder de proliferación.

Por el contrario, las células procedentes de adherencias con predominancia de componente adiposo se encuentran sometidas, *in vivo*, a un menor estímulo de TGF- β 1. Contrarrestado, posiblemente, por la presencia de TGF- β 3. Hemos encontrado una menor capacidad proliferativa en esta población celular durante los primeros días en cultivo. Sin embargo, aumentan su velocidad de proliferación a partir de los ocho días en cultivo. Los ambientes ricos en TGF- β 3 mantendrían el potencial de proliferación e indiferenciación durante largos periodos, permitiendo el estado necesario para la recreación de diferentes estirpes celulares (adipocitos, células endoteliales, células musculares,...).

La morfología de las células procedentes de adherencias no es estable a lo largo de los sucesivos subcultivos. A partir del 5º subcultivo, se produce la ruptura de las uniones intercelulares y la pérdida de la polaridad apico-basal que caracteriza a las células mesoteliales, observándose la predominancia de una población fibroblastoide. Este hecho es observado también en la población control del omentum. Por ello, un mismo comportamiento en cultivo parece indicar y justificar que todas ellas proceden de una misma fuente celular. El estudio de las poblaciones celulares constituyentes de las adherencias y su comparación con las células del omentum no estimulado, nos permite demostrar la existencia de una población de células mesenquimales responsable del comportamiento morfológico homogéneo de las poblaciones a lo largo de los diferentes subcultivos.

Los primeros subcultivos son el momento idóneo para la identificación fenotípica de la naturaleza celular. En ellos, se observó la existencia tanto en el caso de adherencias adiposas como fibrosas, de una cierta población remanente de células que expresan marcadores epiteliales (E-caderina y citoqueratinas) y que presentan la misma morfología mesotelial en empedrado que observamos en los cultivos de células del omentum control.

Si bien, es importante señalar que el bajo porcentaje de células positivas para citoqueratina-18 (típico marcador de célula mesotelial diferenciada) encontrado en las células omentales cultivadas en medio AmnioMAX parece deberse, en parte, al medio de cultivo empleado. Ya que cuando estas células son cultivadas en medio M199

suplementado con factor de crecimiento epitelial aumenta el porcentaje de células citoqueratina-18 positivas. Este estudio se realizó para confirmar la naturaleza de las células obtenidas mediante la extracción a partir del omentum, aunque este comportamiento ya había sido mostrado previamente por nuestro grupo en células humanas (Bellón y cols., 2003). No obstante, el número de células mesoteliales diferenciadas presentes en el omentum control en el presente estudio se encuentra restringido a la monocapa mesotelial, siendo el resto de las células presentes en el cultivo células estromales.

Por el contrario, encontramos un elevado porcentaje de células positivas para la citoqueratina-5 en las células cultivadas en medio AmnioMAX. Este marcador es característico de células epiteliales basales y además reconoce la población de células progenitoras, incluidas las células amplificadoras del tránsito. Este hecho, indica que existe una gran cantidad de células en el omentum que se encuentran comprometidas hacia la línea epitelial y que sólo muestran la citoqueratina-18 característica de las células mesoteliales adultas cuando son cultivadas en el medio adecuado (M199 suplementado con factor de crecimiento epitelial). Así, la expresión de un tipo de citoqueratina u otro depende no sólo del tipo de epitelio, sino también del grado de maduración o diferenciación de éste.

Sin embargo, el bajo porcentaje de citoqueratinas y E-caderina mostrado por las células obtenidas a partir del tejido adherencial parece sugerir una transición del fenotipo epitelial presente en el tejido de origen hacia un fenotipo mesenquimal. Esta población presentaría, *in vivo*, características migratorias, invasivas y fibrogénicas cuando son sometidas al estímulo adecuado. En nuestro caso, el estímulo al que se encuentran sometidas *in vivo* podría ser la presencia de citocinas tras la agresión del mesotelio.

La transformación de las poblaciones celulares de una morfología mesotelial a una morfología mesenquimal, ha sido reseñada con diferentes interpretaciones: cambio de aspecto fenotípico debido a la contaminación celular (Hernando y cols., 1994) y crecimiento fibroblástico o transdiferenciación de mesotelial hacia mesenquimal (Yáñez-Mo y cols., 2003), cuando son estimuladas con TGF- β 1 o en poblaciones celulares procedentes de diálisis peritoneales. También en células epiteliales mamarias se ha observado una transformación fenotípica que resultaba en la adquisición de un fenotipo mesenquimatoso tras la exposición crónica a TGF- β 1 (Miettinen y cols., 1994). O bien las

células procedentes de las adherencias son directamente consideradas como fibroblastos (Saed y cols., 2001). En nuestra opinión, este cambio fenotípico es debido al recambio de las poblaciones a través de los diferentes subcultivos. Así, las células mesenquimales de las adherencias, al proliferar con mayor celeridad que las mesoteliales diferenciadas, se constituyen como la población mayoritaria de los cultivos.

Si bien el cambio morfológico en cultivo parece deberse al recambio celular, el cambio de fenotipo mostrado por las células en el tejido adherencial con respecto al omentum control parece indicar una transición epitelio-mesenquimal ocurrida *in vivo* durante el proceso de formación adherencial. Las adherencias de tipo adiposo aparecen como un estadio intermedio en la diferenciación tisular entre el omentum control y las adherencias de tipo fibroso. La presencia de células positivas para E-caderina y α -actina de músculo liso en las tres poblaciones sugiere que se encontraban en el proceso de transición epitelio-mesenquimal cuando son extraídas del tejido, y que este proceso continúa *in vitro* durante los primeros tiempos. De manera que ambos factores: la transición epitelio-mesenquimal de las células y la elevada tasa de proliferación de las células mesenquimales parecen contribuir a los cambios fenotípicos observados en los cultivos celulares.

La pérdida de la expresión de E-caderina por parte de las células omentales, cuando son tratadas *in vitro* con elevadas concentraciones de citocinas proinflamatorias, ha sido observada por diferentes autores (Ito y cols., 2000; Yáñez-Mo y cols., 2003). La molécula de adhesión intercelular E-caderina desempeña un papel central en el control de la transición epitelio-mesenquimal, ya que la pérdida de su expresión o función correlaciona con la capacidad de las células epiteliales de adoptar una morfología invasiva y migratoria típicamente mesenquimal.

Las células omentales muestran el marcador podocalixina, que pone de manifiesto su carácter hemangioblástico. Este hecho explicaría la elevada capacidad angiogénica del omentum. Los hemangioblastos proceden del mesodermo y son células progenitoras tanto de las células endoteliales como de las hematopoyéticas que dan lugar a la formación de vasos sanguíneos. Durante la diferenciación, los hemangioblastos producen angioblastos, cuya agregación resulta en la formación de los islotes de Wolff y Pander. La fusión de estos islotes resulta en la aparición del plexo vascular sanguíneo primario, que se expande durante la angiogénesis.

Teniendo en cuenta las observaciones histológicas del tejido y los porcentajes de células positivas para E-caderina y α -actina de músculo liso, podemos considerar las adherencias adiposas como un estadio intermedio en la diferenciación celular y tisular entre el omentum control y las adherencias fibrosas, ya que mantienen una morfología próxima al omentum. A medida que disminuye la expresión de E-caderina (en el orden: omentum, adherencia adiposa, adherencia fibrosa), aumenta la de α -actina de músculo liso. El aumento en la expresión de esta última conlleva, además, la reorganización de su citoesqueleto desde el patrón típico de las células epiteliales hacia un patrón de fibras de tensión característico de miofibroblastos. Las adherencias de tipo adiposo muestran la consecución de un fenotipo adiposo a partir de las células mesenquimales presentes en el omentum control, mientras que en las adherencias de tipo fibroso, las células mesenquimales se han diferenciado, en su mayoría, hacia la estirpe miofibroblástica.

Las células de las adherencias de tipo adiposo ya no presentan el marcador para hemangioblastos, podocalixina, encontrado en las células del omentum pero sí presentan una mayor proporción de células positivas para el marcador CD9, característico de los componentes celulares sanguíneos y relacionado con el potencial de diferenciación celular hacia la línea endotelial. Además, se encuentra funcionalmente asociada a la migración celular (Hemler, 1998). Así mismo, expresan marcadores de célula de músculo liso como α -sma, desmina y miosina. La expresión de estos marcadores se podría correlacionar con el ambiente rico en TGF- β 3 *in vivo* que mantiene la indiferenciación y permitirá la recreación de las líneas celulares bajo la influencia de dicha citocina (tejido adiposo, células y estroma vascular). La diferenciación hacia líneas celulares vasculares explica la vascularización encontrada histológicamente en este tejido. Y corrobora nuestros hallazgos previos sobre la expresión de marcadores específicos de células musculares en las células obtenidas a partir de omentum humano (Hernando y cols., 1994). Esta diferenciación hacia la línea muscular lisa vascular que se da *in vivo* durante la formación de una adherencia de tipo adiposo se corresponde con el comportamiento en cultivo de las células obtenidas por Kawaguchi (Kawaguchi y cols., 2007) a partir de explantos de la serosa.

En las adherencias de tipo fibroso hemos encontrado que todas las células expresaban α -sma, mientras que fueron negativas tanto para desmina como para miosina. Este es un hecho distintivo de la estirpe miofibroblástica, célula responsable de la

contractilidad tisular y que explica la mayor deposición de colágeno presente en este tipo de adherencias. La existencia de este tipo celular fue mostrada por otros autores como producto evolutivo final de la transdiferenciación mesotelial (Yang y cols., 2003; Selgas y cols., 2006) o de las células epiteliales alveolares (Wu y cols., 2007) tras la estimulación o presencia de altos niveles del factor pro-fibrótico TGF- β 1. De manera que la diferenciación de la célula mesenquimal mesotelial hacia esta estirpe celular podría venir causada por la presencia de un ambiente local altamente inflamatorio con un ratio elevado de TGF- β 1/ TGF- β 3 y/o por el estímulo mecánico sufrido por las células inmersas en la red de fibrina que se encuentra uniendo dos superficies peritoneales opuestas y sometida a los movimientos propios de éstas.

El tejido adherencial muestra la persistencia de marcadores celulares indiferenciados. El estado indiferenciado de la célula mesenquimal puede ser actualmente evaluado a través de la expresión de factores de transcripción o proteínas citoplásmicas que mantienen su multipotencialidad. En nuestro modelo, la expresión de SSEA-4 y Oct3/4 fue observada en las tres poblaciones celulares de estudio en porcentajes muy elevados en el primer subcultivo. El mantenimiento de estos marcadores en todas las poblaciones indica un origen común, descartando la implicación de miofibroblastos preexistentes adultos. Otros autores (Lucas y cols., 1996b; Bittinger y cols., 1999) ya defendieron la existencia de células mesenquimales durante la reparación de grandes defectos peritoneales y avalan nuestra hipótesis de que las células responsables de la regeneración mesotelial son las mismas que dan lugar al tejido adherencial.

Se ha argumentado (Raftery, 1973) que en condiciones de isquemia las células mesenquimales pueden no proliferar y por tanto, no aparecerían las células mesoteliales en estas condiciones, o lo harían más lentamente. Esto podría llevar a que el mesotelio no fuera capaz de regenerarse antes de que se formaran las adherencias. Sin embargo, desde nuestro punto de vista, la hipoxia es un factor inductor de la migración celular sobre la matriz de fibrina de las células de la superficie opuesta a la zona isquémica, además de las poblaciones submesoteliales de la zona dañada. Ello apoya la implicación de las células mesenquimales omentales en la formación adherencial.

Kawaguchi y cols. (2007) han demostrado que las células diferenciadas de la serosa mantenían su potencial vasculogénico debido a su diferenciación hacia células de músculo liso. Nosotros hemos demostrado además esta capacidad vasculogénica mediante

la expresión de podocalixina en el 100% de la población mesotelial procedente de omentum. La podocalixina es un marcador de los progenitores hematopoyéticos durante el desarrollo así como de progenitores de células sanguíneas y endotelio vascular (hemangioblastos).

Las células procedentes del primer subcultivo todavía mantienen el fenotipo adquirido *in vivo*, permitiéndonos así estudiar su naturaleza. Hemos encontrado dos fenotipos diferentes en las células del tejido adherencial. Esta elevada “plasticidad” mostrada *in vivo* nos ha llevado a considerarlas como células mesenquimales. Y su evolución posterior hacia dos tejidos adherenciales diferentes, vendría determinada por el entorno local. Especialmente por la presencia y distribución de TGF- β 1, TGF- β 3 y VEGF. Así como por el grado de hipoxia al que se encuentre sometido el tejido.

EFICACIA DEL PROCEDIMIENTO ADHESIOLÍTICO

La presencia de un cuerpo extraño, como es un biomaterial, puede inducir modificaciones en el proceso reparativo normal. Hasta el momento, la disección quirúrgica de las adherencias es la única solución para tratar esta complicación. Generalmente, la mayoría de los cirujanos están en contra de la realización de la adhesiolisis en pacientes sintomáticos sin ninguna evidencia objetiva de obstrucción intestinal. Esta postura se debe a la posibilidad de reformación adherencial, en un 55-100% de los pacientes (Pittaway y cols., 1985; Trimbo-Kemper y cols., 1985) y que podría generar síntomas peores a los sufridos por el paciente previamente al proceso adhesiolítico (Luciano y cols., 2008). Sin embargo, el procedimiento adhesiolítico presenta un porcentaje de éxito, en cuanto a la reversibilidad de la infertilidad causada por adherencias, de un 38-50% (Caspi y cols., 1979; Diamond, 1979; Tulandi, 1986) de pacientes que consiguen quedar embarazadas tras la resección adherencial.

Existen muchos estudios en cuanto a la eficacia en la prevención de la reformación adherencial. Se han realizado estudios comparativos entre la adhesiolisis laparoscópica y la adhesiolisis mediante la técnica abierta convencional (Diamond y cols., 1987; Luciano y Montanino-Oliva, 1994; Tittel y cols., 2001) encontrándose que, en general, el procedimiento laparoscópico muestra una reducción en la formación/reformación adherencial (Luciano y cols., 1989; Lundorff y cols., 1991; Moore y cols., 1995; Schäfer y cols., 1998; Garrard y cols., 1999; Caínzos y cols., 2006) como

resultado de una menor agresión peritoneal, así como de una menor hemorragia producida durante el procedimiento y un aumento de la actividad fibrinolítica en plasma (Rahr y cols., 1999). Sin embargo, se ha encontrado una cierta relación entre la formación adherencial y el neumoperitoneo necesario para el desarrollo de la laparoscopia (Binda y cols., 2006; Peng y cols., 2009).

El estudio evolutivo del proceso de formación y reformación adherencial realizado mediante laparoscopia secuencial nos ha permitido concluir que las adherencias ya se encuentran formadas a los 3 días post-cirugía. En este tiempo la mayoría de las adherencias formadas eran de tipo omental, mostrando una gran capacidad adhesiogénica de este tejido. Las adherencias entre la malla protésica y las asas intestinales aparecían con menor frecuencia y a 3 días post-implante aparecían como adherencias de tipo laxo, fácil disección y en ocasiones eliminadas como consecuencia del neumoperitoneo necesario para llevar a cabo la técnica laparoscópica. A pesar de la elevada vascularización de la serosa intestinal, a este tiempo tan temprano no se observaba neoangiogénesis desde la serosa hacia la prótesis. El estudio histológico del tejido adherencial de 3 días confirmaba la presencia de vasos de gran tamaño que parecían corresponder a los propios del omentum, pero la angiogénesis era prácticamente nula.

La estabilización del tejido adherencial se produce entre los 3 y los 7 días tras la agresión al peritoneo, observándose una gran angiogénesis a los 7 y 14 días post-cirugía. A partir de los 3 días post-cirugía no se formaban adherencias *de novo*, se observó simplemente la evolución del tejido ya formado. A 90 días post-cirugía este tejido volvía a presentar un aspecto adiposo y parecía más engrosado. Se producía un crecimiento de tejido adiposo alrededor del tejido adherencial formado a tiempos anteriores, sin representar un aumento significativo en la superficie de la malla cubierta por adherencias.

El momento crítico para la formación adherencial según algunos autores serían los primeros 7 días post-cirugía, ya que a partir de este momento no se forman adherencias nuevas (Felemovicius y cols., 2004) y se observa una lámina mesotelial confluyente, no identificando, a 3 días, células mesoteliales en la vertiente visceral de la superficie protésica. En estudios previos de nuestro grupo, se demostraba que la mesotelización es un proceso precoz y a los 3 días ya es posible observar la presencia de las primeras células mesoteliales cubriendo la superficie de la malla (Bellón y cols., 2000), si bien la completa recuperación del mesotelio no se observaba hasta los 7 días. Chegini

(1997) demostró que los niveles de los factores de crecimiento se encuentran elevados entre los cinco y los siete días tras el daño. Estos resultados coinciden con lo que hemos encontrado en este estudio: los niveles proteicos de VEGF y TGF- β 1 muestran su máxima presencia a los 7 días post-cirugía. Sin embargo, estamos en desacuerdo con su afirmación de que dado que estos momentos son críticos en la remesotelización, serían los días más adecuados para la aplicación de medidas preventivas.

Para nosotros, el momento crítico para la formación adherencial son los tres primeros días post-cirugía, ya que es el momento a partir del cual no se forman adherencias nuevas, mientras que la estabilización del tejido adherencial se encuentra a partir de los 7 días, cuando se aprecia un cambio sustancial en el aspecto de la adherencia y su grado de vascularización, derivando en una adherencia de tipo firme o integrado. Las medidas preventivas deberían tomarse previamente. Esto podría estar relacionado con los elevados porcentajes de reformación adherencial encontrados en estudios en los que se realizaba la adhesiolisis a tiempos más largos (posteriores a 3 días) tras la cirugía inicial conducente a la formación adherencial (Tittel y cols., 2001, Prushik y cols., 2007).

Hobson y cols. (2003) mostraban que incluso el tejido no dañado procedente de pacientes con adherencias mostraba niveles de TGF- β 1 superiores a los encontrados en el grupo control. Este hecho podría explicar tanto las elevadas tasas de reformación de adherencias previas, como la aparición de adherencias de novo tras la realización de un procedimiento adhesiolítico. Este hecho también apoya nuestra hipótesis de que la adhesiolisis debe realizarse previamente a la activación del TGF- β 1. Es decir, antes de los 7 días post-cirugía.

Al realizar la adhesiolisis a los 3 días post-cirugía, se comprobaba la incapacidad de éstas para reformarse. En algunas zonas se observaban pequeños parches de tejido adiposo sobre la superficie de la malla, que podrían corresponder a restos omentales que quedaron adheridos en el momento de la resección adherencial. Este tejido, lejos de suponer una complicación, previene la reformación adherencial hacia la malla, mediante la producción de factores fibrinolíticos por parte de las células mesenquimales y mesoteliales que lo integran (Gervin y cols., 1973; Buckman y cols., 1976b; Whitaker y cols., 1982; Doody y cols., 1989) y la creación de una barrera mecánica que no evita la exposición del submesotelio adherente subyacente. De manera que el omentum podría resultar de importancia en la prevención de la formación adherencial, hasta el punto de

encontrarse un aumento significativo en el número de adherencias tras la realización de una omentectomía (Cerci y cols., 2008).

Hemos demostrado que el tiempo transcurrido desde la formación adherencial y la realización del proceso adhesiolítico es un factor crítico. La idoneidad de los 3 días post-cirugía parece encontrarse estrechamente relacionada con la evolución histológica e inmunohistoquímica del tejido adherencial en ese momento. En general, el estudio evolutivo del perfil del tejido adherencial realizado en nuestro primer objetivo, nos ha permitido estudiar la evolución de las respuestas inmunológica e inflamatoria causadas por la incorporación de un cuerpo extraño y una agresión quirúrgica. Hemos de destacar que desde un perfil basal mostrado por el omentum (ausencia de actividad inflamatoria y/o inmunológica con un nivel considerable de TGF- β 1 almacenado en estado latente), se encuentra un claro cambio de perfil al producirse una adherencia. Las adherencias de 3 días muestran la formación de agregados de macrófagos peritoneales. Y una presencia limitada de la forma activa del TGF- β 1. Chegini y cols (1994a) ya demostraron la necesidad de la confluencia de dos hechos para que la formación adherencial tuviera lugar. En primer lugar, debe producirse una agresión en la cavidad peritoneal. Y, en segundo lugar, debe producirse una activación considerable de TGF- β 1 en la zona dañada durante el proceso de la respuesta inflamatoria. Este último hecho no lo encontramos en las adherencias de 3 días, por lo que el tejido adherencial no ha alcanzado aún la estabilidad.

A los 7 días, las adherencias muestran un ambiente muy inflamatorio con cantidades elevadas de factores de crecimiento. Como consecuencia de este proceso inflamatorio, se produce un aumento de la permeabilidad capilar y del flujo sanguíneo hacia el foco de la lesión. Con la presencia de TGF- β 1 maduro y VEGF, se produce la neoangiogénesis observada en este estadio.

A los 14 días, el tejido adherencial se muestra estable sin signos de actividad inflamatoria y/o inmune, tan sólo se encuentran macrófagos remanentes. Se ha alcanzado la meseta del proceso cicatrizal.

Sin embargo, este proceso no ha finalizado y el tejido adherencial, a 90 días, muestra una actividad positiva para linfocitos CD4 y para el TGF β 1, tanto a nivel génico como proteico. Además de una limitada presencia de macrófagos.

El mantenimiento de un cierto número de macrófagos a lo largo del tiempo podría estar relacionado con su papel en la iniciación de la degradación de la MEC, probablemente a través de la inducción de MMPs. Lo que explicaría la reversibilidad del proceso fibrótico entre los 14 y 90 días post-implante. Duffield y cols. (2005) proporcionaban las primeras evidencias sobre la existencia de diferentes subpoblaciones de macrófagos, existentes en el mismo tejido, que jugarían un papel crítico en las diferentes fases de la cicatrización inflamatoria. Demostraron que la depleción macrofágica durante la resolución del proceso fibrótico podría retardar la degradación de la matriz extracelular. De manera que la persistencia de un ambiente inflamatorio favorece la reversibilidad del proceso fibrótico.

Así, el perfil que muestran las adherencias de 3 días nos permite definir este momento como el más adecuado para la resección adherencial, pues la respuesta inflamatoria máxima todavía no se ha desencadenado y el bajo grado de angiogénesis hará que la adhesiolisis en este momento produzca un menor sangrado y, por tanto, menor deposición de fibrina que a tiempos posteriores. Sin embargo, a 7 días, el pico inflamatorio es elevado y la respuesta a una segunda agresión como puede ser la resección del tejido conduciría a la reformación adherencial. A 14 y 90 días el tejido ya cicatrizado muestra una alta actividad tisular muy diferenciada y con un alto índice de vascularización, por lo que el acto de disección quirúrgica se comportaría casi como una primera agresión con una elevada probabilidad de generación adherencial.

Por todo lo anterior, podemos concluir que el momento óptimo para realizar la resección adherencial y evitar su reformación es a los 3 días post-cirugía, en el que el perfil del tejido adherencial muestra una reducción temporal de la actividad proinflamatoria a favor de la respuesta inmunológica. La superficie mesotelial encontrada sobre la superficie protésica a 90 días proporciona una lámina antiadherente hacia la vertiente visceral de la pared abdominal, simulando el mesotelio peritoneal no dañado y evitando, en lo sucesivo, la formación de adherencias.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos podemos establecer las siguientes conclusiones:

- La agresión mecánica producida por la presencia de un biomaterial sobre el omentum y la reacción inmune/inflamatoria de este último parecen generar una activación de las células mesenquimales subyacentes para generar un tejido de reparación transitorio y sensible a las señales ambientales que puede culminar en la formación estable de una adherencia omental.
- La reacción a cuerpo extraño del omentum genera una respuesta inmunitaria/inflamatoria cuyo lugar de ubicación y patrón de distribución parece ser relevante en el balance local de las isoformas TGF- β 1 y TGF- β 3, y así, en el tipo de respuesta reparadora del omentum.
- La predominancia de la isoforma TGF- β 1 en el tejido adherencial omental se observa de forma conjunta a la diferenciación de la célula mesenquimal hacia la estirpe miofibroblástica, dando lugar a un proceso cicatrizal donde la contracción juega un papel fundamental. La predominancia de la isoforma TGF- β 3 parece correlacionarse con un proceso regenerativo del tejido adiposo omental.
- La elevada respuesta inflamatoria encontrada a los 7 días (elevada presencia de TGF- β 1, TGF- β 3, VEGF y macrófagos y linfocitos activados) parece favorecer el desencadenamiento de la diferenciación y estabilización tisular.
- La consolidación a largo plazo (90 días) del tejido adherencial y la presencia de glomérulos omentales, macrófagos y linfocitos T CD4 activados en este tejido parecen indicar el mantenimiento o perpetuación de la reacción a cuerpo extraño debida a la presencia del biomaterial e independiente de la lesión mecánica inicial.

Todo lo anterior nos permitió, por tanto, elevar la **HIPÓTESIS** planteada:

¿Se puede definir un momento óptimo para la realización de la adhesiolisis como medida preventiva de la reformación adherencial a partir de las características del tejido que las constituye?

A la categoría de **TESIS**, afirmando que:

El análisis detallado y secuencial de los eventos tisulares del tejido adherencial omental nos ha permitido establecer que, a los 3 días post-implante, las adherencias están formadas por un tejido mesenquimal no comprometido ubicado en un ambiente moderadamente inflamatorio, lo que hace de este momento el más idóneo para la prevención eficaz de su reformación tras la resección.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

Ala-Kulju K, Virkkula L. Use of omental pedicle for treatment of Buerger's disease affecting the upper extremities. A modified technique. *Vasa* 1990;19(4): 330-3

Aldemir M, Oztürk H, Erten C, Büyükbayram H. The preventive effect of Rofecoxib in postoperative intraperitoneal adhesions. *Acta Chir Belg* 2004; 104(1): 97-100

Allan EH, Martin TJ. The plasminogen activator inhibitor system in bone cell function. *Clin Orthop Relat Res* 1995; 313: 54-63

Andreoli SP, Mallett C, Williams K, McAteer JA, Rothlein R, Doerschuk CM. Mechanisms of polymorphonuclear leukocyte mediated peritoneal mesothelial cell injury. *Kidney Int* 1994; 46(4): 1100-9

Andres JL, Stanley K, Cheifetz S, Massagué J. Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor- β . *J Cell Biol* 1989; 109(6): 3137-45

Ar´Rajab A, Dawidson I, Sentementes J, Silkes P, Harris R, Mileski W. Enhancement of peritoneal macrophages reduces postoperative peritoneal adhesion formation. *J Surg Res*. 1995; 58(3): 307-12

Arnás M, Ballester JF, Molinos JR, Álvarez A. Growth factors: current knowledge's situation. *Rev Esp Odontoestomatológica de implantes* 2002; 10(4): 202-8

Arribas J, López-Casillas F, Massagué J. Role of juxtamembrane domains of the transforming growth factor- β precursor and the β -amyloid protein in the regulated ectodomain shedding. *J Biol Chem* 1997; 272(27): 17160-65

Asano T, Takazawa R, Yamato M, Kageyama Y, Kihara K, Okano T. Novel and simple method for isolating autologous mesothelial cells from the tunica vaginalis. *BJU Int* 2005; 96(9): 1409-13

Asano T, Takazawa R, Yamato M, Kihara K, Okano T. Mesothelial cells from tunica vaginalis, a practical source for mesothelial transplantation. *Int J Artif Organs* 2007; 30(6): 495-500

Atamas SP, Yurovsky VV, Wise R, Wigley FM, Goter Robinson CJ, Henry P, Alms WJ, White B. Production of type 2 cytokines by CD8⁺ lung cells is associated with greater decline in pulmonary function in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1999; 42(6): 1168-78

Attisano L, Wrana JL, López-Casillas F, Massagué J. TGF- β receptors and actions. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1222(1): 71-80

Azuma H, Kondo T, Mikami M, Harii K. Treatment of chronic osteomyelitis by transplantation of autogenous omentum with microvascular anastomosis. A preliminary report. *Acta Orthop Scand* 1976; 47(3): 271-5

Bakkum EA, Trimpos-Kemper TC. Natural course of postsurgical adhesions. *Microsurgery* 1995; 16(9): 650-4

Baptista ML, Bonsack ME, Felemovicius I, Delaney JP. Abdominal adhesions to prosthetic mesh evaluated by laparoscopy and electron microscopy. *J Am Coll Surg* 2000; 190(3): 271-80

Barazzone C, Belin D, Piguet PF, Vassalli JD, Sappino AP. Plasminogen activator inhibitor-1 in acute hyperoxic mouse lung injury. *J Clin Invest* 1996; 98(12): 2666-73

Barcellos-Hoff MH, Dix TA. Redox-mediated activation of latent transforming growth factor- β 1. *Mol Endocrinol* 1996; 10(9): 1077-83

Barcellos-Hoff MH, Ewan KB. Transforming growth factor- β and breast cancer: Mammary gland development. *Breast Cancer Res* 2000; 2(2): 92-9

Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marmé D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996; 87(8): 3336-43

Barnard JA, Lyons RM, Moses HL. The cell biology of transforming growth factor β . *Biochim Biophys Acta* 1990; 1032(1): 79-87

Beelen RH, Oosterling SJ, van Egmond M, van den Born J, Zareie M. Omental milky spots in peritoneal pathophysiology (spots before your eyes). *Perit Dial Int* 2005; 25(1): 30-2

Bellón JM. Biological prostheses: indications and usefulness in the repair of abdominal wall defect. *Cir Esp* 2008; 83(6): 283-9

Bellón JM, Buján J, Contreras L, Hernando A. Integration of biomaterials implanted into abdominal wall: process of scar formation and macrophage response. *Biomaterials* 1995; 16(5): 381-7

Bellón JM, Buján J, Contreras L, Hernando A, Jurado F. Macrophage response to experimental implantation of polypropylene prostheses. *Eur Surg Res* 1994; 26(1): 46-53

Bellón JM, Contreras LA, Buján J, Jurado F. Effect of phosphatidylcholine on the process of peritoneal adhesion following implantation of a polypropylene mesh prosthesis. *Biomaterials* 1996; 17(14): 1369-72

Bellón JM, Contreras LA, Pascual G, Buján J. Evaluation of the acute scarring response to the implant of different types of biomaterial in the abdominal wall. *J Mater Sci Mater Med* 2000; 11(1): 25-9

Bellón JM, García-Carranza A, Jurado F, García-Honduvilla N, Carrera-San Martín A, Buján J. Evaluation of a new composite prosthesis (PL-PU99) for the repair of abdominal wall defects in terms of behavior at the peritoneal interface. *World J Surg* 2002; 26(6): 661-6

Bellón JM, García-Honduvilla N, López R, Corrales C, Jurado F, Buján J. In vitro mesothelialization of prosthetic materials designed for the repair of abdominal wall defects. *J Mater Sci Mater Med* 2003; 14(4): 359-64

Bellón JM, Rodríguez M, García-Honduvilla N, Gómez-Gil V, Pascual G, Buján J. Seguimiento del comportamiento peritoneal de diferentes biomateriales empleando laparoscopia secuencial. Aplicabilidad en la reparación de hernias ventrales. *Cir Esp* 2007a; 82(5): 290-6

Bellón JM, Rodríguez M, García-Honduvilla N, Gómez-Gil V, Pascual G, Buján J. Comparing the behavior of different polypropylene meshes (heavy and lightweight) in an experimental model of ventral hernia repair. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009; 89(2): 448-55

Bellón JM, Rodríguez M, García-Honduvilla N, Pascual G, Buján J. Efficiency of 4% icodextrin in preventing adhesions to spiral tacks used to fix intraperitoneal prostheses. *Eur Surg Res* 2006; 38(5): 458-63

Bellón JM, Rodríguez M, García-Honduvilla N, Pascual G, Buján J. Partially absorbable meshes for hernia repair offer advantages over nonabsorbable meshes. *Am J Surg* 2007b; 194(1): 68-74

Bellón JM, Rodríguez M, García-Honduvilla N, Pascual G, Gómez-Gil V, Buján J. Peritoneal effects of prosthetic meshes used to repair abdominal wall defects: monitoring adhesions by sequential laparoscopy. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2007c; 17(2):160-6

Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 1999; 103(2): 159-65

Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surg* 1993; 166(1): 74-81

Bergström M, Falk P, Holmdahl L. CO₂ promotes plasminogen activator inhibitor type 1 expression in human mesothelial cells. *Surg Endosc* 2003; 17(11): 1818-22

Bertozi P, Astedt B, Zenzius L, Lynch K, LeMaire F, Zapol W, Chapman HA Jr. Depressed bronchoalveolar urokinase activity in patients with adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 1990; 322(13): 890-7

Best CL, Rittenhouse D, Vasquez C, Norng T, Subias E, Sueldo CE. Evaluation of interceed (TC7) for reduction of postoperative adhesions in rabbits. *Fertil Steril* 1992; 58(4): 817-20

Binda MM, Molinas CR, Hansen P, Koninckx PR. Effect of desiccation and temperature during laparoscopy on adhesion formation in mice. *Fertil Steril* 2006; 86(1): 166-75

Binnebösel M, Klinge U, Rosch R, Junge K, Lynen-Jansen P, Schumpelick V. Morphology, quality, and composition in mature human peritoneal adhesions. *Langenbecks Arch Surg* 2008a; 393(1): 59-66

Binnebösel M, Rosch R, Junge K, Lynen-Jansen P, Schumpelick V, Klinge U. Macrophage and T-lymphocyte infiltrates in human peritoneal adhesions indicate a chronic inflammatory disease. *World J Surg* 2008b; 32(2): 296-304

Bittinger F, Schepp C, Brochhausen C, Lehr HA, Otto M, Köhler H, Skarke C, Walgenbach S, Kirkpatrick CJ. Remodeling of peritoneal-like structures by mesothelial cells: its role in peritoneal healing. *J Surg Res* 1999; 82(1): 28-33

Bohórquez-Sierra JC. Metaloproteinasas de matriz: su implicación en las enfermedades vasculares periféricas. *Angiología* 2006; 58(4): 269-77

Boland GM, Weigel RJ. Formation and prevention of postoperative abdominal adhesions. *J Surg Res* 2006; 132(1): 3-12

Border WA, Noble NA. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331(19): 1286-92

Border WA, Ruoslahti E. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest* 1992; 90(1): 1-7

Breborowicz A, Rodela H, Pagiamtzis J, Oreopoulos DG. Simulation of mesothelial cells proliferation by endogenous growth factor(s). *Perit Dial Int* 1991; 11(3): 228-32

Bright RM, Birchard SJ, Long GG. Repair of thoracic wall defects in the dog with an omental pedicle flap. *J Am Anim Hosp Assoc* 1982; 18: 277-82

Buckman RF Jr, Buckman PD, Hufnagel HV, Gervin AS. A physiologic basis for the adhesion-free healing of deperitonealized surfaces. *J Surg Res* 1976a; 21(2): 67-76

Buckman RF, Woods M, Sargent L, Gervin AS. A unifying pathogenetic mechanism in the etiology of intraperitoneal adhesions. *J Surg Res* 1976b; 20(1): 1-5

Bulbulla N, Ilhan YS, Kirkil C, Cetiner M, Gogebakan O, Ilhan N. Can angiotensin converting enzyme inhibitors prevent postoperative adhesions? *J Surg Res* 2005; 125(1): 94-7

Cahill RA, Redmond HP. Cytokine orchestration in post-operative peritoneal adhesion formation. *World J Gastroenterol* 2008; 14(31): 4861-6

Cahill RA, Wang JH, Soohkai S, Redmond HP. Mast cells facilitate local VEGF release as an early event in the pathogenesis of postoperative peritoneal adhesions. *Surgery* 2006; 140(1): 108-12

Cáinzos M, Mena E, Martínez J, Rodríguez-Couso JL. An appraisal of icodextrin solution in the prevention and development of intra-abdominal adhesions. An experimental study. *Inflamm Res* 2007; 56(Suppl 2): S201-S202

Cáinzos M, Rodríguez-Segade F, Martínez-Castro J, Prieto D, Becker MR, Aneiros F, Cortes J. Intra-abdominal adhesions after open and laparoscopic cholecystectomy: an experimental model. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2006; 16(2): 108-12

Cannaday JE. Some uses of undetached omentum in surgery. *Am J Surg* 1948; 76(5): 502-5

Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438(7070): 932-936

Caspi E, Halperin Y, Bukovsky I. The importance of periadnexal adhesion in tubal reconstructive surgery for infertility. *Fertil Steril* 1979; 31(3): 296-300

Casten DF, Alday ES. Omental transfer for revascularization of the extremities. *Surg Gynecol Obstet* 1971; 132(2): 301-4

Celebioglu B, Eslambouli NR, Olcay E, Atakan S. The effect of tenoxicam on intraperitoneal adhesions and prostaglandin E2 levels in mice. *Anesth Analg* 1999; 88(4): 939-42

Cerci C, Eroglu E, Sutcu R, Celikbas B, Kilbas A. Effects of omentectomy on the peritoneal fibrinolytic system. *Surg Today* 2008; 38(8): 711-5

Chalkiadakis GE, Kostakis A, Karayannacos PE, Chalkiadakis ME, Sgouromali S, Giamarellou H, Skalkeas GD. Pentoxifylline in the treatment of experimental peritonitis in rats. *Arch Surg* 1985; 120(10): 1141-4

Chegini N. The role of growth factors in peritoneal healing: Transforming growth factor β (TGF- β). *Eur J Surg Suppl* 1997; 577: 17-23

Chegini N, Gold LI, Williams RS, Masterson BJ. Localization of transforming growth factor beta isoforms TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3 in surgically induced pelvic adhesions in the rat. *Obstet Gynecol* 1994b; 83(3): 449-54

Chegini N, Kotseos K, Zhao Y, Bennett B, McLean FW, Diamond MP, Holmdahl L, Burns J. Differential expression of TGF-beta1 and TGF-beta3 in serosal tissues of human intraperitoneal organs and peritoneal adhesions. *Hum Reprod* 2001; 16(6): 1291-300

Chegini N, Simms J, Williams RS, Masterson BJ. Identification of epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha, and epidermal growth factor receptor in surgically induced pelvic adhesions in the rat and intraperitoneal adhesions in the human. *Am J Obstet Gynecol* 1994a; 171(2): 321-7

Chiaromonte MG, Donaldson DD, Cheever AW, Wynn TA. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *J Clin Invest* 1999; 104(6): 777-85

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1): 156-9

Chung DR, Chitnis T, Panzo RJ, Kasper DL, Sayegh MH, Tzianabos AO. CD4⁺ T cells regulate surgical and postinfectious adhesion formation. *J Exp Med* 2002; 195(11): 1471-8

Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30(3): 293-8

Coker RK, Laurent GJ, Shahzeidi S, Lympay PA, du Bois RM, Jeffery PK, McAnulty RJ. Transforming growth factors-beta 1, -beta 2, and -beta 3 stimulate fibroblast procollagen production in vitro but are differentially expressed during bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Pathol* 1997; 150(3): 981-91

Collen D, Lijnen HR. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 1991; 78(12): 3114-24

Condon ET, Cahill RA, O'malley DB, Aherne NJ, Redmond HP. Evaluation of postoperative peritoneal adhesion formation following perioperative nicotine administration. *J Surg Res* 2007; 140(1): 135-8

Confino E, Friberg J, Vermesh M, Thomas W, Gleicher N. Effects of progesterone on postoperative adhesion formation in hysterectomized rabbits. *Int J Fertil* 1988; 33(2): 139-42

Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R, Siegel N, Haymore BL, Leimgruber R, Feder J. Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. J Biol Chem 1989; 264(33): 20017-24

Conze J, Rosch R, Klinge U, Weiss C, Anurov M, Titkova S, Oettinger A, Schumpelick V. Polypropylene in the intra-abdominal position: influence of pore size and surface area. Hernia 2004; 8(4): 365-72

Costa RG, Lontra MB, Scalco P, Cavazzola LT, Gurski RR. Polylactic acid film versus acellular porcine small intestinal submucosa mesh in peritoneal adhesion formation in rats. Acta Cir Bras 2009; 24(2):128-35

Cotran R, Kumar V, Collins T. Reparación de los tejidos: proliferación celular, fibrosis y curación de las heridas. En: Patología estructural y funcional. McGraw-Hill-Interamericana 2000; pp. 95-120

Cranshaw ML, Leak LV. Milky spots of the omentum: a source of peritoneal cells in the normal and stimulated animal. Arch Histol Cytol 1990;53 Suppl:165-77

Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β 1 *in vivo*. Cell 1998; 93(7): 1159-70

Cromack DT, Porras-Reyes B, Mustoe TA. Current concepts in wound healing: growth factor and macrophage interaction. J Trauma 1990; 30(12): S129-33

Cromack DT, Sporn MB, Roberts AB, Merino MJ, Dart LL, Norton JA. Transforming growth factor β levels in rat wound chambers. J Surg Res 1987; 42(6): 622-8

Cui L, Johkura K, Liang Y, Teng R, Ogiwara N, Okouchi Y, Asanuma K, Sasaki K. Biodefense function of omental milky spots through cell adhesion molecules and leukocyte proliferation. *Cell Tissue Res* 2002; 310(3): 321-30

Cunningham MW. Cardiac myosin and the TH1/TH2 paradigm in autoimmune myocarditis. *Am J Pathol* 2001; 159(1): 5-12

Czarniecki CW, Chiu HH, Wong GH, McCabe SM, Palladino MA. Transforming growth factor- β 1 modulates the expression of class II histocompatibility antigens on human cells. *J Immunol* 1988; 140(12): 4217-23

Czernobilsky B, Moll R, Levy R, Franke WW. Co-expression of cytokeratin and vimentin filaments in mesothelial, granulosa and rete ovarii cells of the human ovary. *Eur J Cell Biol* 1985; 37: 175-90

De la Portilla F, Ynfante I, Bejarano D, Conde J, Fernández A, Ortega JM, Carranza G. Prevention of peritoneal adhesions by intraperitoneal administration of vitamin E: an experimental study in rats. *Dis Colon Rectum* 2004; 47(12): 2157-61

De Virgilio C, Elbassir M, Hidalgo A, Schaber B, French S, Amin S, Stabile BE. Fibrin glue reduces the severity of intra-abdominal adhesions in a rat model. *Am J Surg* 1999; 178(6): 577-80

De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992; 255(5047): 989-91

De Winter H, Cheroutre H, Kronenberg M. Mucosal immunity and inflammation. II. The yin and yang of T cells in intestinal inflammation: pathogenic and protective roles in a mouse colitis model. *Am J Physiol* 1999; 276(6 Pt 1): G1317-21

DeCherney AH, diZerega GS. Clinical problem of intraperitoneal postsurgical adhesion formation following general surgery and the use of adhesion prevention barriers. *Surg Clin North Am* 1997; 77(3): 671-88

Deng G, Curriden SA, Wang S, Rosenberg S, Loskutoff DJ. Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release? *J Cell Biol* 1996; 134(6): 1563-71

Desmoulière A, Gabbiani G. Myofibroblast differentiation during fibrosis. *Exp Nephrol* 1995; 3(2): 134-9

Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993; 122(1): 103-11

Di Paolo N, Sacchi G, Garosi G, Sansoni E, Bargagli L, Ponzo P, Tanganelli P, Gaggiotti E. Omental milky spots and peritoneal dialysis-review and personal experience. *Perit Dial Int* 2005; 25(1): 48-57

Diamond E. Lysis of postoperative pelvic adhesions in infertility. *Fertil Steril* 1979; 31(3): 287-95

Diamond MP. Postoperative adhesion development after operative laparoscopy: evaluation at early second-look procedures. *Fertil Steril* 1991; 55(4): 700-4

Diamond MP, Daniell JF, Feste J, Surrey MW, McLaughlin DS, Friedman S, Vaughn WK, Martin DC. Adhesion reformation and de novo adhesion formation after reproductive pelvic surgery. *Fertil Steril* 1987; 47(5): 864-6

Diamond MP, El-Hammady E, Munkarah A, Bieber EJ, Saed G. Modulation of the expression of vascular endothelial growth factor in human fibroblasts. *Fertil Steril* 2005; 83(2): 405-9

Diamond MP, Kruger M, Saed GM. Effect of Tisseel on expression of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1. *Fertil Steril* 2004; 81(6): 1657-64

DiZerega GS. Contemporary adhesion prevention. *Fertil Steril* 1994; 61(2): 219-35

DiZerega GS. Biochemical events in peritoneal tissue repair. *Eur J Surg Suppl* 1997; 577: 10-6

DiZerega GS. Peritoneum, peritoneal healing, and adhesion formation. En: DiZerega. *Peritoneal Surgery*. New York: Springer-Verlag; 2000. pp. 3-37

DiZerega GS, Campeau JD. Use of instillates to prevent intraperitoneal adhesions: crystalloid and dextran. *Infertil Reprod Med Clin North Am* 1994; 5: 463-78

DiZerega GS, Verco SJ, Young P, Kettel M, Kobak W, Martin D, Sanfilippo J, Peers EM, Scrimgeour A, Brown CB. A randomized, controlled pilot study of the safety and efficacy of 4% icodextrin solution in the reduction of adhesions following laparoscopic gynaecological surgery. *Hum Reprod* 2002; 17(4): 1031-8

Dobbie JW. Morphology of the peritoneum in CAPD. *Blood Purif* 1989; 7(2-3): 74-85

Doody KJ, Dunn RC, Buttram VC Jr. Recombinant tissue plasminogen activator reduces adhesion formation in a rabbit uterine horn model. *Fertil Steril* 1989; 51(3): 509-12

Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Lang R, Iredale JP. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* 2005; 115(1): 56-65

Dvorak HF. Angiogenesis: update 2005. *J Thromb Haemost* 2005; 3(8): 1835-42

Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh J, Dvorak AM. Fibrin containing gels induce angiogenesis: Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* 1987; 57(6): 673-86

Eddy AA. Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7(12): 2495-508

Eitzman DT, McCoy RD, Zheng X, Fay WP, Shen T, Ginsburg D, Simon RH. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in transgenic mice that either lack or overexpress the murine plasminogen activator inhibitor-1 gene. *J Clin Invest* 1996; 97(1): 232-7

Ellis H. The aetiology of post-operative abdominal adhesions. An experimental study. *Br J Surg* 1962; 50: 10-6

Ellis H. The cause and prevention of intestinal adhesions. *Br J Surg* 1982; 69(5): 241-3

Ellis H. The hazards of surgical glove dusting powders. *Surg Gynecol Obstet* 1990; 171(6): 521-7

Ellis H. The magnitude of adhesion related problems. *Ann Chir Gynaecol* 1998; 87(1): 9-11

Ellis H, Harrison W, Hugh TB. The healing of peritoneum under normal and pathological conditions. *Br J Surg* 1965; 52: 471-6

Epstein JC, Wilson MS, Wilkosz S, Ireland G, O'Dwyer ST, Herrick SE. Human peritoneal adhesions show evidence of tissue remodeling and markers of angiogenesis. *Dis Colon Rectum* 2006; 49(12): 1885-92

Eskeland G, Kjaerheim A. Regeneration of parietal peritoneum in rats. 2. An electron microscopical study. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1966; 68(3): 379-95

Falk P, Ma C, Chegini N, Holmdahl L. Differential regulation of mesothelial cell fibrinolysis by transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1). *Scand J Clin Lab Invest* 2000; 60(6): 439-48

Fang KC, Raymond WW, Blount JL, Caughey GH. Dog mast cell alpha-chymase activates progelatinase B by cleaving the Phe88-Gln89 and Phe91-Glu92 bonds of the catalytic domain. *J Biol Chem* 1997; 272(41): 25628-35

Fang KC, Wolters PJ, Steinhoff M, Bidgol A, Blount JL, Caughey GH. Mast cell expression of gelatinases A and B is regulated by kit ligand and TGF-beta. *J Immunol* 1999; 162(9): 5528-35

Fayez JA, Schneider PJ. Prevention of pelvic adhesions formation by different modalities of treatment. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157(5): 1184-8

Felemovicius I, Bonsack ME, Hagerman G, Delaney JP. Prevention of adhesions to polypropylene mesh. *J Am Coll Surg* 2004; 198(4):543-8

Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280(6): C1358-66

Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 2002; 29(6 Suppl 16): 10-4

Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18(1): 4-25

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9(6): 669-76

Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161(2): 851-8

Fiedler EP, Guzick DS, Guido R, Kanbour-Shakir A, Krasnow JS. Adhesion formation from release of dermoid contents in the peritoneal cavity and effect of copious lavage: a prospective, randomized, blinded, controlled study in a rabbit model. *Fertil Steril* 1996; 65(4): 852-9

Fletcher NM, Jiang ZL, Diamond MP, Abu-Soud HM, Saed GM. Hypoxia-generated superoxide induces the development of the adhesion phenotype. *Free Radic Biol Med*. 2008; 45(4): 530-6

Foley-Comer AJ, Herrick SE, Al-Mishlab T, Prêle CM, Laurent GJ, Mutsaers SE. Evidence for incorporation of free-floating mesothelial cells as a mechanism of serosal healing. *J Cell Sci* 2002; 115(Pt 7): 1383-9

Frank BT, Rossall JC, Caughey GH, Fang KC. Mast cell tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is cleaved and inactivated extracellularly by alpha-chymase. *J Immunol* 2001; 166(4): 2783-92

Frank S, Madlener M, Werner S. Transforming growth factors beta1, beta2, and beta3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 1996; 271(17): 10188-93

Fukasawa M, Bryant SM, diZerega GS. Incorporation of thymidine by fibroblasts: evidence for complex regulation by postsurgical macrophages. *J Surg Res* 1988; 45(5): 460-6

Fukasawa M, Campeau JD, Girgis W, Bryant SM, Rodgers KE, diZerega GS. Production of protease inhibitors by postsurgical macrophages. *J Surg Res* 1989; 46(3): 256-61

Gabbiani G. Modulation of fibroblastic cytoskeletal features during wound healing and fibrosis. *Pathol Res Pract* 1994; 190(9-10): 851-3

Gaertner WB, Hagerman GF, Felemovicius I, Bonsack ME, Delaney JP. Two experimental models for generating abdominal adhesions. *J Surg Res* 2008; 146(2): 241-5

Gálvez-Gastélum FJ, Sandoval-Rodríguez AS, Armendáriz-Borunda J. El factor de crecimiento transformante β como blanco terapéutico. *Salud Publica Mex* 2004; 46(4): 341-50

Garosi G, Di Paolo N. Recent advances in peritoneal morphology: the milky spots in peritoneal dialysis. *Adv Perit Dial* 2001; 17: 25-8

Garrard CL, Clements RH, Nanney L, Davidson JM, Richards WO. Adhesion formation is reduced after laparoscopic surgery. *Surg Endosc* 1999; 13(1): 10-3

Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2001; 2(2): 108-15

Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 1997; 272(38): 23659-67

Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998a; 273(21): 13313-6

Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998b; 273(46): 30336-43

Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res* 2003; 314(1): 15-23

Gervin AS, Puckett CL, Silver D. Serosal hypofibrinolysis. A cause of postoperative adhesions. *Am J Surg* 1973; 125(1): 80-8

Ghellai AM, Stucchi AF, Chegini N, Ma C, Andry CD, Kaseta JM, Burns JW, Skinner KC, Becker JM. Role of transforming growth factor beta-1 in peritonitis-induced adhesions. *J Gastrointest Surg* 2000; 4(3): 316-23

Ghosh J, Murphy MO, Turner N, Khwaja N, Halka A, Kielty CM, Walker MG. The role of transforming growth factor beta1 in the vascular system. *Cardiovasc Pathol* 2005; 14(1): 28-36

Gleizes PE, Munger JS, Nunes I, Harpel JG, Mazziere R, Noguera I, Rifkin DB. TGF- β latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem cells* 1997; 15(3): 190-

Goldsmith HS. The evolution of omentum transposition: from lymphedema to spinal cord, stroke and Alzheimer's disease. *Neurol Res* 2004; 26(5): 586-93

Goldsmith HS, Duckett S, Chen WF. Spinal cord vascularization by intact omentum. *Am J Surg* 1975; 129(3): 262-5

Gómez-Gil V, Pascual G, García-Honduvilla N, Rodríguez M, Buján J, Bellón JM. Characterizing omental adhesions by culturing cells isolated from a novel in vivo adhesion model. *Wound Repair Regen* 2009; 17(1): 51-61

Goodman JW. On the origin of peritoneal fluid cells. *Blood* 1964; 23: 18-26

Gorvy DA, Herrick SE, Shah M, Ferguson MW. Experimental manipulation of transforming growth factor- β isoforms significantly affects adhesion formation in a murine surgical model. *Am J Pathol* 2005; 167(4): 1005-19

Griffel MI, Kaufman BS. Pharmacology of colloids and crystalloids. *Crit Care Clin* 1992; 8(2): 235-53

Griffith CA. The family of Ringer's solutions. *NITA J Natl intravenous Therap Assoc* 1986; 9(6): 480-3

Hagiwara A, Takahashi T, Sawai K, Taniguchi H, Shimotsuma M, Okano S, Sakakura C, Tsujimoto H, Osaki K, Sasaki S, y Shirasu M. Milky spots as the implantation site for malignant cells in peritoneal dissemination in mice. *Cancer Res* 1993; 53(3): 687-92

Halme M, Maasilta P, Repo H, Leirisalo-Repo M, Taskinen E, Mattson K, Cantell K. Subcutaneously administered recombinant interferon-gamma in humans: pharmacokinetics and effects on chemiluminescence responses of alveolar macrophages, blood neutrophils, and monocytes. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1994; 15(4): 283-91

Hamel KJ. Incidence of adhesions at repeat cesarean delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196(5): e31-32

Haney AF, Doty E. The formation of coalescing peritoneal adhesions requires injury to both contacting peritoneal surfaces. *Fertil Steril* 1994; 61(4): 767-75

Harada S, Dannenberg AM Jr, Vogt RF Jr, Myrick JE, Tanaka F, Redding LC, Merkhofer RM, Pula PJ, Scott AL. Inflammatory mediators and modulators released in organ culture from rabbit skin lesions produced in vivo by sulfur mustard. III. Electrophoretic protein fractions, trypsin-inhibitory capacity, alpha 1-proteinase inhibitor, and alpha 1- and alpha 2-macroglobulin proteinase inhibitors of culture fluids and serum. *Am J Pathol* 1987; 126(1): 148-63

Hellebrekers BW, Trimbos-Kemper TC, Trimbos JB, Emeis JJ, Kooistra T. Use of fibrinolytic agents in the prevention of postoperative adhesion formation. *Fertil Steril* 2000; 74(2): 203-12

Hemler ME. Integrin associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10(5): 578-85

Henkin J, Marcotte P, Yang HC. The plasminogen-plasmin system. *Prog Cardiovasc Dis* 1991; 34(2): 135-64

Hernández-Pando R. Participación del factor de transformación tumoral- β en la regulación de la inflamación y la respuesta inmunológica. *Gac Med Mex* 2003; 139(2): 135-138

Hernando A, García-Honduvilla N, Bellón JM, Buján J, Navlet J. Coatings for vascular prostheses: mesothelial cells express specific markers for muscle cells and have biological activity similar to that of endothelial cells. *Eur J Vasc Surg* 1994; 8(5): 531-6

Herndon DN, Nguyen TT, Gilpin DA. Growth factors. Local and systemic. *Arch Surg* 1993; 128(11): 1227-33

Herrera HR, Geary J, Whitehead P, Evangelisti S. Revascularization of the lower extremity with omentum. *Clin Plast Surg* 1991; 18(3): 491-5

Herrick SE, Mutsaers SE, Ozua P, Sulaiman H, Omer A, Boulos P, Foster ML, Laurent GJ. Human peritoneal adhesions are highly cellular, innervated, and vascularized. *J Pathol* 2000; 192(1): 67-72

Higashiyama M, Hashimoto K, Takada A, Fujita K, Kido K, Yoshikawa K. The role of growth factor in wound healing. *J Dermatol* 1992; 19(11): 676-9

Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(16): 9349-54

Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, Shibuya M. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2002; 2(4): 289-300

Hirschi KK, Rohovsky SA, D'Amore PA. PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J Cell Biol* 1998; 141(3): 805-14

Hobson KG, DeWing M, Ho HS, Wolfe BM, Cho K, Greenhalgh DG. Expression of transforming growth factor beta 1 in patients with and without previous abdominal surgery. *Arch Surg* 2003; 138(11): 1249-52

Holmdahl L. The role of fibrinolysis in adhesion formation. *Eur J Surg Suppl* 1997; 577: 24-31

Holmdahl L, Ivarsson ML. The role of cytokines, coagulation, and fibrinolysis in peritoneal tissue repair. *Eur J Surg* 1999; 165(11): 1012-9

Holmdahl L, Kotseos K, Bergström M, Falk P, Ivarsson ML, Chegini N. Overproduction of transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1) is associated with adhesion formation and peritoneal fibrinolytic impairment. *Surgery* 2001; 129(5): 626-32

Holtz G, Neff M, Mathur S, Perry LC. Effect of medroxyprogesterone acetate on peritoneal adhesion formation. *Fertil Steril* 1983; 40(4): 542-4

Hosgood G. The omentum—the forgotten organ: physiology and potential surgical applications in dogs and cats. *Comp Cont Ed Pract Vet* 1990; 12: 45-51

Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991; 5(12): 1806-14

Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992; 267(36): 26031-7

Huse M, Muir TW, Xu L, Chen YG, Kuriyan J, Massagué J. The TGF β receptor activation process: an inhibitor-to substrate-binding switch. *Mol Cell* 2001; 8(3): 671-82

Idell S, James KK, Levin EG, Schwartz BS, Manchanda N, Maunder RJ, Martin TR, McLarty J, Fair DS. Local abnormalities in coagulation and fibrinolytic pathways predispose to alveolar fibrin deposition in the adult respiratory distress syndrome.

J Clin Invest 1989; 84(2): 695-705

Inge TH, McCoy KM, Susskind BM, Barrett SK, Zhao G, Bear HD. Immunomodulatory effects of transforming growth factor-beta on T lymphocytes. Induction of CD8 expression in the CTLL-2 cell line in normal thymocytes. J Immunol 1992; 148(12): 3847-56

Irkorucu O, Ferahköle Z, Memil L, Ekinci O, Akin M. Reduction of postsurgical adhesions in a rat model: a comparative study. Clinics 2009; 64(2):143-8.

Ito N, Claesson-Welsh L. Dual effects of heparin on VEGF binding to VEGF receptor-1 and transduction of biological responses. Angiogenesis 1999; 3(2): 159-66

Ito N, Huang K, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptor-1 wild type and mutant proteins. Cell Signal 2001; 13(11): 849-54

Ito T, Yeo Y, Highley CB, Bellas E, Benitez CA, Kohane DS. The prevention of peritoneal adhesions by in situ cross-linking hydrogels of hyaluronic acid and cellulose derivatives. Biomaterials 2007a; 28(6): 975-83

Ito T, Yeo Y, Highley CB, Bellas E, Kohane DS. Dextran-based in situ cross-linked injectable hydrogels to prevent peritoneal adhesions. Biomaterials 2007b; 28(23): 3418-26

Ito T, Yorioka N, Yamamoto M, Kataoka D, Yamakido M. Effect of glucose on intercellular junctions of cultured human peritoneal mesothelial cells. J Am Soc Nephrol 2000; 11(11): 1969-79

Ivarsson ML, Falk P, Holmdahl L. Response of visceral peritoneum to abdominal surgery. *Br J Surg* 2001; 88(1): 148-51

Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 2008; 73(7): 751-62

Kawaguchi M, Bader DM, Wilm B. Serosal mesothelium retains vasculogenic potential. *Dev Dyn* 2007; 236(11): 2973-9

Kennedy KJ, Karpus WJ. Role of chemokines in the regulation of Th1/Th2 and autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Immunol* 1999; 19(5): 273-9

Ketteler M, Noble NA, Border WA. Increased expression of transforming growth factor-beta in renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1994; 3(4): 446-52

Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R, Ferrara N. The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* 1996; 271(13): 7788-95

Khalil N. TGF-beta. En: Latent to active. *Microbes Infect* 1999; 1(15): 1255-63

Kim HM, Choi DH, Lee YM. Inhibition of wound-induced expression of transforming growth factor-beta 1 mRNA by its antisense oligonucleotides. *Pharmacol Res* 1998; 37(4): 289-93

Kim SJ, Angel P, Lafyatis R, Hattori K, Kim KY, Sporn MB, Karin M, Roberts AB. Autoinduction of transforming growth factor beta is mediated by the AP-1 complex. *Mol Cell Biol* 1990; 10(4): 1492-5

Kingsley DM. The TGF- β superfamily: New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994; 8(2): 133-46

Kitching AR, Holdsworth SR, Ploplis VA, Plow EF, Collen D, Carmeliet P, Tipping PG. Plasminogen and plasminogen activators protect against renal injury in crescentic glomerulonephritis. *J Exp Med* 1997; 185(5): 963-8

Kluger Y, Weinbroum A, Ben-Avraham R, Galili Y, Klausner J, Rabau M. Reduction in formation of peritoneal adhesions by methylene blue in rats: a dose response study. *Eur J Surg* 2000; 166(7): 568-71

Kofford MW, Schwartz LB, Schechter NM, Yager DR, Diegelmann RF, Graham MF. Cleavage of type I procollagen by human mast cell chymase initiates collagen fibril formation and generates a unique carboxyl-terminal propeptide. *J Biol Chem* 1997; 272(11): 7127-31

Kuraoka S, Campeau JD, Rodgers KE, Nakamura RM, DiZerega GS. Effects of interleukin-1 (IL-1) on postsurgical macrophage secretion of protease and protease inhibitor activities. *J Surg Res* 1992; 52(1): 71-8

Kuwata N, Igarashi H, Ohmura T, Aizawa S, Sakaguchi N. Cutting edge: absence of expression of RAG1 in peritoneal B-1 cells detected by knocking into RAG1 locus with green fluorescent protein gene. *J Immunol* 1999; 163(12): 6355-9

Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* 1997; 11(2): 118-24

Lawrence DA. Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur Cytokine Netw* 1996; 7(3): 363-74

Leach RE, Burns JW, Dawe EJ, SmithBarbour MD, Diamond M. Reduction of postsurgical adhesion formation in the rabbit uterine horn model with use of hyaluronate/carboxymethylcellulose gel. *Fertil Steril* 1998; 69(3): 415-8

Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune response by TGF β . *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 137-61

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246(4935): 1306-09

Li TC, Cooke ID. The value of an absorbable adhesion barrier, Interceed, in the prevention of adhesion reformation following microsurgical adhesiolysis. *Br J Obstet Gynaecol* 1994; 101(4): 335-9

Li WY, Huang EY, Dudas M, Kaartinen V, Warburton D, Tuan TL. Transforming growth factor- β 3 affects plasminogen activator inhibitor-1 expression in fetal mice and modulates fibroblast-mediated collagen gel contraction. *Wound Rep Regen* 2006; 14(5): 516-25

Liakakos T, Thomakos N, Fine PM, Dervenis C, Young RL. Peritoneal adhesions: etiology, pathophysiology, and clinical significance. Recent advances in prevention and management. *Dig Surg* 2001; 18(4): 260-73

Liberek T, Chmielewski M, Lichodziejewska-Niemierko M, Lewandowski K, Rutkowski B. Transmigration of blood leukocytes into the peritoneal cavity is related to the upregulation of ICAM-1 (CD54) and Mac-1 (CD11b/CD18) adhesion molecules. *Perit Dial Int* 2004; 24(2): 139-46

Liebermann-Meffert D. The greater omentum. Anatomy, embryology, and surgical applications. *Surg Clin North Am* 2000; 80(1): 275-93

Liebman SM, Langer JC, Marshall JS, Collins SM. Role of mast cells in peritoneal adhesion formation. *Am J Surg* 1993; 165(1): 127-30

Lijnen HR, Collen D. Matrix metalloproteinase system deficiencies and matrix degradation. *Thromb Haemost* 1999; 82(2): 837-45

Lim R, Morrill JM, Lynch RC, Reed KL, Gower AC, Leeman SE, Stucchi AF, Becker JM. Practical limitations of bioresorbable membranes in the prevention of intra-abdominal adhesions. *J Gastrointest Surg* 2009; 13(1): 35-42

Litbarg NO, Gudehithlu KP, Sethupathi P, Arruda JA, Dunea G, Singh AK. Activated omentum becomes rich in factors that promote healing and tissue regeneration. *Cell Tissue Res* 2007; 328(3): 487-97

Lomo J, Blomhof HK, Beiske K, Stokke T, Smeland EB. TGF-beta I and cyclic AMP promote apoptosis in resting human B lymphocytes. *J Immunol* 1995; 154(4): 1634-43

López-Casillas F, Payne HM, Andrés JL, Massagué J. Betaglycan can act as dual modulator of TGF- β access to signalling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol* 1994; 124(4): 557-68

Lucas PA, Warejcka DJ, Young HE, Lee BY. Formation of abdominal adhesion is inhibited by antibodies to transforming growth factor- β 1. *J Surg Res* 1996a; 65(2): 135-8

Lucas PA, Warejcka DJ, Zhang LM, Newman WH, Young HE. Effect of rat mesenchymal stem cells on development of abdominal adhesions after surgery. *J Surg Res* 1996b; 62(2): 229-32

Luciano AA, Maier DB, Koch EI, Nulsen JC, Whitman GF. A comparative study of postoperative adhesions following laser surgery by laparoscopy versus laparotomy in the rabbit model. *Obstet Gynecol.* 1989; 74(2): 220-4

Luciano AA, Montanino-Oliva M. Comparison of postoperative adhesion formation laparoscopy versus laparotomy. *Infertil Reprod Med Clinics North Am.* 1994; 5: 437-44

Luciano DE, Roy G, Luciano AA. Adhesion reformation after laparoscopic adhesiolysis: where, what type, and in whom they are most likely to recur. *J Minim Invasive Gynecol* 2008; 15(1): 44-8

Lukacs NW, Hogaboam C, Chensue SW, Blease K, Kunkel SL. Type 1/type 2 cytokine paradigm and the progression of pulmonary fibrosis. *Chest* 2001; 120(1 Suppl): 5S-8S

Lundorff P, Hahlin M, Källfelt B, Thorburn J, Lindblom B. Adhesion formation after laparoscopic surgery in tubal pregnancy: a randomized trial versus laparotomy. *Fertil Steril* 1991; 55(5): 911-5

Ma C, Tarnuzzer RW, Chegini N. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in mesothelial cells and their regulation by transforming growth factor-beta1. *Wound Repair Regen* 1999; 7(6): 477-85

Madelenat P, Palmer R. Etude critique des libérations percoelioscopiques des adhérences péri-annexielles. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 1979; 8(4): 347-52

Mage G, Canis M, Pouly JL, y cols. Adhesions scores. *Gynecol Obstet* 1995; special issue: 114-5

Mage G, Pouly JL, de Jolinière JB, Chabrand S, Riouallon A, Bruhat MA. A preoperative classification to predict the intrauterine and ectopic pregnancy rates after distal tubal microsurgery. *Fertil Steril* 1986; 46(5): 807-10

Mandache E, Moldoveanu E, Negoescu A. Lymphatic follicle-like structures in the stimulated omental milky spots. *Morphol Embryol (Bucur)*. 1987; 33(4): 285-9

Mandriota SJ, Menoud PA, Pepper MS. Transforming growth factor beta 1 down-regulates vascular endothelial growth factor receptor 2/flk-1 expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1996; 271(19): 11500-5

Martínez-Ezquerro JD, Herrera LA. Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. *Cancerología* 2006; 1: 83-96

Massagué J. The transforming growth factor- β family. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6: 597-641

Massagué J. TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 753-791

Massagué J. How cells read TGF- β signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1(3): 169-78

Massagué J, Cheifetz S, Boyd FT, Andres JL. TGF-beta receptors and TGF-beta binding proteoglycans: recent progress in identifying their functional properties. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 593: 59-72

Massagué J, Chen YG. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 2000; 14(6): 627-44

Masuda T, Furue M, Matsuda T. Novel strategy for soft tissue augmentation based on transplantation of fragmented omentum and preadipocytes. *Tissue Eng* 2004; 10(11-12): 1672-83

Matthews BD, Pratt BL, Pollinger HS, Backus CL, Kercher KW, Sing RF, Heniford BT. Assessment of adhesion formation to intra-abdominal polypropylene mesh and polytetrafluoroethylene mesh. *J Surg Res* 2003; 114(2): 126-32

Mavalia C, Scaletti C, Romagnani P, Carossino AM, Pignone A, Emmi L, Pupilli C, Pizzolo G, Maggi E, Romagnani S. Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis. *Am J Pathol* 1997; 151(6): 1751-8

Mazzieri R, Masiero L, Zanetta L, Monea S, Onisto M, Garbisa S, Mignatti P. Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *EMBO J* 1997; 16(9): 2319-32

McCartney-Francis N, Mizel D, Wong H, Whal L, Whal S. TGF- β regulates production of growth factors and TGF- β by human peripheral blood monocytes. *Growth Factors* 1990; 4(1): 27-35

McLean DH, Buncke HJ Jr. Autotransplant of omentum to a large scalp defect, with microsurgical revascularization. *Plast Reconstr Surg* 1972; 49(3): 268-74

Menzies D, Ellis H. Intestinal obstruction from adhesions. How big is the problem? *Ann R Coll Surg Engl* 1990; 72(1): 60-3

Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R. TGF- β induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol* 1994; 127(6 Pt 2): 2021-36

Millauer B, Longhi MP, Plate KH, Shawver LK, Risau W, Ullrich A, Strawn LM. Dominant-negative inhibition of Flk-1 supresses the growth of many tumor types in vivo. *Cancer Res* 1996; 56(7): 1615-20

Miyazono K, Heldin CH. Latent forms of TGF-beta: molecular structure and mechanisms of activation. *Ciba Found Symp* 1991; 157: 81-92

Mizutani H, Schechter N, Lazarus G, Black RA, Kupper TS. Rapid and specific conversion of precursor interleukin 1 beta (IL-1 beta) to an active IL-1 species by human mast cell chymase. *J Exp Med* 1991; 174(4): 821-5

Molloy RG, Moran KT, Waldron RP, Brady MP, Kirwan WO. Massive incisional hernia: abdominal wall replacement with Marlex mesh. *Br J Surg* 1991; 78(2): 242-4

Monk BJ, Berman ML, Montz FJ. Adhesions after extensive gynecologic surgery: clinical significance, etiology and prevention. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170(5 Pt 1): 1396-403

Moore RG, Partin AW, Adams JB, Kavoussi LR. Adhesion formation after transperitoneal nephrectomy: laparoscopic v open approach. *J Endourol* 1995; 9(3): 277-80

Müller SA, Treutner KH, Haase G, Kinzel S, Tietze L, Schumpelick V. Effect of intraperitoneal antiadhesive fluids in a rat peritonitis model. *Arch Surg* 2003; 138(3): 286-90

Müller SA, Treutner KH, Tietze L, Anurov M, Titkova S, Polivoda M, Oettinger AP, Schumpelick V. Efficacy of adhesion prevention and impact on wound healing of intraperitoneal phospholipids. *J Surg Res* 2001; 96(1): 68-74

Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF β 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 1999; 96(3): 319-28

Muramatsu M, Katada J, Hayashi I, Majima M. Chymase as a proangiogenic factor. A possible involvement of chymase-angiotensin-dependent pathway in the hamster sponge angiogenesis model. *J Biol Chem* 2000; 275(8): 5545-52

Mutsaers SE, Whitaker D, Papadimitriou JM. Mesothelial regeneration is not dependent on subserosal cells. *J Pathol* 2000; 190(1): 86-92

Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, Lawitts JA, Benjamin L, Tan X, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med* 2002; 196(11): 1497-506

Nair SK, Bath IK, Aurora AL. Role of proteolytic enzyme in the prevention of postoperative intraperitoneal adhesions. *Arch Surg* 1974; 108(6): 849-53

Nehéz L, Vödrös D, Axelsson J, Tingstedt B, Lindman B, Andersson R. Prevention of postoperative peritoneal adhesions: effects of lysozyme, polylysine and polyglutamate versus hyaluronic acid. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40(9): 1118-23

Nemir P Jr. Intestinal obstruction; ten-year statistical survey at the Hospital of the University of Pennsylvania. *Ann Surg* 1952; 135(3): 367-75

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13(1): 9-22

Neufeld G, Cohen T, Shraga N, Lange T, Kessler O, Herzog Y. The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12(1): 13-9

Nezhat CR, Nezhat FR, Metzger DA, Luciano AA. Adhesion reformation after reproductive surgery by videolaseroscopy. *Fertil Steril* 1990; 53(6): 1008-11

Nur I, Lyahovetsky Y, Bar L, Schon M. Commercial fibrin sealants are not equivalent in a rabbit liver-resection model which quantitatively evaluates hemostasis and formation of adhesions. *Eur Surg Res* 2005; 37(3): 159-65

Ohtsuka H, Torigai K, Itoh M. Free omental transfer to the lower limbs. *Ann Plast Surg*. 1980; 4(1): 70-8

O'Kane S, Ferguson MW. Transforming growth factor β s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29(1): 63-78.

Ordóñez JL, Domínguez J, Evrard V, Koninckx PR. The effect of training and duration of surgery on adhesion formation in the rabbit model. *Hum Reprod* 1997; 12(12): 2654-7

Orita H, Campeau JD, Gale JA, Nakamura RM, DiZerega GS. Differential secretion of plasminogen activator activity by postsurgical activated macrophages. *J Surg Res* 1986a; 41(6): 569-73

Orita H, Campeau JD, Nakamura RM, DiZerega GS. Modulation of fibroblast proliferation and transformation by activated macrophages during postoperative peritoneal reepithelialization. *Am J Obstet Gynecol* 1986b; 155(4): 905-11

Orlidge A, D'Amore PA. Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1987; 105(3): 1455-62

Ozmen MM, Aslar AK, Terzi MC, Albayrak L, Berberoglu M. Prevention of adhesions by bioresorbable tissue barrier following laparoscopic intraabdominal mesh insertion. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2002; 12(5): 342-6

Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 1994; 269(41): 25646-54

Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993; 4(12): 1317-26

Parker MC, Wilson MS, Menzies D, Sunderland G, Clark DN, Knight AD, Crowe AM. The SCAR-3 study: 5-year adhesion-related readmission risk following lower abdominal surgical procedures. *Colorectal Dis* 2005; 7(6): 551-8

Parker MC, Wilson MS, Menzies D, Sunderland G, Thompson JN, Clark DN, Knight AD, Crowe AM. Colorectal surgery: the risk and burden of adhesion-related complications. *Colorectal Dis* 2004; 6(6): 506-11

Parsak CK, Satar S, Akcam T, Satar D, Sungur I. Effectiveness of treatment to prevent adhesions after abdominal surgery: an experimental evaluation in rats. *Adv Ther* 2007; 24(4): 796-802

Peacock KE, Hurst BS, Marshburn PB, Matthews ML. Effects of fibrin sealant on single-layer uterine incision closure in the New Zealand white rabbit. *Fertil Steril* 2006; 85(Suppl 1): 1261-4

Peng Y, Zheng M, Ye Q, Chen X, Yu B, Liu B. Heated and humidified CO₂ prevents hypothermia, peritoneal injury, and intra-abdominal adhesions during prolonged laparoscopic insufflations. *J Surg Res* 2009; 151(1): 40-7

Peralta-Zaragoza O, Lagunas-Martínez A, Madrid-Marina V. Transforming growth factor beta-1: structure, function, and regulation mechanisms in cancer. *Salud Publica Mex* 2001; 43(4): 340-51

Perry JF Jr, Smith GA, Yonehiro EG. Intestinal obstruction caused by adhesions: a review of 388 cases. *Ann Surg* 1955; 142(5): 810-6

Persinger MA, Lepage P, Simard JP, Parker GH. Mast cell numbers in incisional wounds in rat skin as a function of distance, time and treatment. *Br J Dermatol* 1983; 108(2): 179-87

Pinho Mde F, Hurtado SP, El-Cheikh MC, Borojevic R. Haemopoietic progenitors in the adult mouse omentum: permanent production of B lymphocytes and monocytes. *Cell Tissue Res* 2005; 319(1): 91-102

Pinson DM, LeClaire RD, Lorsbach RB, Parmely MJ, Russell SW. Regulation by transforming growth factor-beta 1 of expression and function of the receptor for IFN-gamma on mouse macrophages. *J Immunol* 1992; 149(6): 2028-34

Pittaway DE, Daniell JF, Maxson WS. Ovarian surgery in an infertility patient as an indication for a short-interval second-look laparoscopy: a preliminary study. *Fertil Steril* 1985; 44(5): 611-4

Plate KH, Warnke PC. Vascular endothelial growth factor. *J Neurooncol* 1997; 35(3): 365-72

Platell C, Cooper D, Papadimitriou JM, Hall JC. The omentum. *World J Gastroenterol*. 2000; 6(2): 169-176

Pötzsch B, Grulich-Henn J, Rössing R, Wille D, Müller-Berghaus G. Identification of endothelial and mesothelial cells in human omental tissue and in omentum-derived cultured cells by specific cell markers. *Lab Invest*. 1990; 63(6): 841-52

Powell DW. Myofibroblasts: paracrine cells important in health and disease. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2000; 111: 271-93

Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 1999; 277(1 Pt 1): C1-9

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine; Society of Reproductive Surgeons. Pathogenesis, consequences, and control of peritoneal adhesions in gynecologic surgery. *Fertil Steril* 2007; 88(1): 21-6

Prieto M, Rivas JV, López Novoa JM, Pérez-Barriocanal F. TGF-beta: synthesis and mechanism of action. *Nefrología* 2002; 22(2): 135-43

Prushik SG, Aarons CB, Matteotti R, Reed KL, Gower AC, Leeman SE, Stucchi AF, Becker JM. A neurokinin 1 receptor antagonist decreases adhesion reformation after laparoscopic lysis of adhesions in a rat model of adhesion formation. *Surg Endosc* 2007; 21(10): 1790-5

Räb LE. Causes of abdominal adhesions in cases of intestinal obstruction. *Acta Chir Scand* 1969; 135(1): 73-6

Raftery AT. Regeneration of parietal and visceral peritoneum in the immature animal: a light and electron microscopical study. *Br J Surg* 1973; 60(12): 969-75

Raftery AT. Regeneration of peritoneum: a fibrinolytic study. *J Anat* 1979; 129(Pt 3): 659-64

Rahr HB, Fabrin K, Larsen JF, Thorlacius-Ussing O. Coagulation and fibrinolysis during laparoscopic cholecystectomy. *Thromb Res* 1999; 93(3): 121-7

Ranges GE, Figari IS, Espevik T, Palladino MA. Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1987; 166(4): 991-8

Ray NF, Denton WG, Thamer M, Henderson SC, Perry S. Abdominal adhesiolysis: inpatient care and expenditures in the United States in 1994. *J Am Coll Surg* 1998; 186(1): 1-9

Rendu F, Brohard-Bohn. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and function. *Plateletes* 2001; 12(5): 261-73

Reuning U, Magdolen V, Wilhelm O, Fischer K, Lutz V, Graeff H, Schmitt M. Multifunctional potencial of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (review). *Int J Oncol* 1998; 13(5): 893-906

Ribeiro SM, Poczatek M, Schultz-Cherry S, Villain M, Murphy-Ullrich JE. The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 1999; 274(19): 13586-93

Rijhwani A, Sen S, Gunasekaran S, Ponnaiya J, Balasubramanian KA, Mammen KE. Allopurinol reduces the severity of peritoneal adhesions in mice. *J Pediatr Surg* 1995; 30(4): 533-7

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386(6626): 671-74

Risberg B. Adhesions: preventive strategies. *Eur J Surg Suppl* 1997; 577: 32-9

Risberg B, Eriksson E, Björk S, Hansson GK. Immunohistochemical localization of plasminogen activators in human saphenous veins. *Thromb Res.* 1986; 41(3): 301-8

Roberts AB. Transforming growth factor-beta: Activity and efficacy in animal models of wound healing. *Wound Repair Regen* 1995; 3(4): 408-18

Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF- β . *Miner Electrolyte Metab* 1998; 24(2-3): 111-9

Roberts AB, Sporn MB. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor- β (TGF- β). *Growth Factors* 1993;8(1): 1-9

Rodgers KE, DiZerega GS. Modulation of peritoneal re-epithelialization by postsurgical macrophages. *J Surg Res* 1992; 53(5): 542-8

Rojas IG, Rudolph MI. Mast cells and their proteases in oral inflammation. *Rev Chil Periodon Oseoint* 2005; 2(2): 18-23

Rondeau E, Mougenot B, Lacave R, Peraldi MN, Kruithof EK, Sraer JD. Plasminogen activator inhibitor 1 in renal fibrin deposits of human nephropathies. *Clin Nephrol* 1990; 33(2): 55-60

Rong H, Tang XM, Zhao Y, Juneja SC, Fay MF, Williams RS. Postsurgical intraperitoneal exposure to glove powders modulates inflammatory and immune-related cytokine production. *Wound Repair Regen* 1997; 5(1): 89-96

Rout UK, Oommen K, Diamond MP. Altered expressions of VEGF mRNA splice variants during progression of uterine-peritoneal adhesions in the rat. *Am J Reprod Immunol* 2000; 43(5): 299-304

Rout UK, Saed GM, Diamond MP. Transforming growth factor- β 1 modulates expression of adhesion and cytoskeletal proteins in human peritoneal fibroblasts. *Fertil Steril* 2002; 78(1): 154-61

Ryan GB, Grob ty J, Majno G. Mesothelial injury and recovery. *Am J Pathol* 1973; 71(1): 93-112

Saarinen J, Kalkkinen N, Welgus HG, Kovanen PT. Activation of human interstitial procollagenase through direct cleavage of the Leu83-Thr84 bond by mast cell chymase. *J Biol Chem* 1994; 269(27): 18134-40

Saed GM, Collins KL, Diamond MP. Transforming growth factors beta1, beta2 and beta3 and their receptors are differentially expressed in human peritoneal fibroblasts in response to hypoxia. *Am J Reprod Immunol* 2002; 48(6): 387-93

Saed GM, Diamond MP. Hypoxia-induced irreversible up-regulation of type I collagen and transforming growth factor-beta 1 in human peritoneal fibroblasts. *Fertil Steril* 2002; 78(1): 144-7

Saed GM, Zhang W, Chegini N, Holmdahl L, Diamond MP. Transforming growth factor beta isoforms production by human peritoneal mesothelial cells after exposure to hypoxia. *Am J Reprod Immunol* 2000; 43(5): 285-91

Saed GM, Zhang W, Diamond MP. Molecular characterization of fibroblasts isolated from human peritoneum and adhesions. *Fertil Steril* 2001; 75(4): 763-8

Sahin M, Cakir M, Avsar FM, Tekin A, Kucukkartallar T, Akoz M. The effects of anti-adhesion materials in preventing postoperative adhesion in abdominal cavity (anti-adhesion materials for postoperative adhesions). *Inflammation* 2007; 30(6): 244-9

Saksela O, Hovi T, Vaheri A. Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor secreted by cultured human monocyte-macrophages. *J Cell Physiol* 1985; 122(1): 125-32

Salim R, Kadan Y, Nachum Z, Edelstein S, Shalev E. Abdominal scar characteristics as a predictor of intra-abdominal adhesions at repeat cesarean delivery. *Fertil Steril* 2008; 90(6): 2324-7

Sato Y, Tsuboi R, Lyons R, Moses H, Rifkin DB. Characterization of the activation of latent TGF- β by co-cultures of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells: a self-regulating system. *J Cell Biol* 1990; 111(2): 757-63

Schäfer M, Krähenbühl L, Büchler MW. Comparison of adhesion formation in open and laparoscopic surgery. *Dig Surg* 1998; 15(2): 148-52

Schindler AE. Gonadotropin-releasing hormone agonists for prevention of postoperative adhesions: an overview. *Gynecol Endocrinol* 2004; 19(1): 51-5

Schreinemacher MH, Emans PJ, Gijbels MJ, Greve JW, Beets GL, Bouvy ND. Degradation of mesh coatings and intraperitoneal adhesion formation in an experimental model. *Br J Surg* 2009; 96(3): 305-13

Scott-Coombes D, Whawell S, Vipond MN, Thompson J. Human intraperitoneal fibrinolytic response to elective surgery. *Br J Surg* 1995; 82(3): 414-7

Selgas R, Bajo A, Jiménez-Heffernan JA, Sánchez-Tomero JA, Del Peso G, Aguilera A, López-Cabrera M. Epithelial-to-mesenchymal transition of the mesothelial cell-its role in the response of the peritoneum to dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(2): ii2- 7

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219(4587): 983-5

Sepilian V, Ku L, Wong H, Liu CY, Phelps JY. Prevalence of infraumbilical adhesions in women with previous laparoscopy. *JSLs* 2007; 11(1): 41-4

Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci* 1995; 108(Pt 3): 985-1002

Shah S, Qiao L. Resting B cells expand a CD4+CD25+Foxp3+ Treg population via TGF-beta3. *Eur J Immunol* 2008; 38(9): 2488-98

Shamiyeh A, Danis J, Benkő L, Vattay P, Röth E, Tulipan L, Shebl O, Wayand W. Effect of hyaluron derivate gel in prevention of postsurgical peritoneal adhesions-an experimental study in pigs. *Hepatogastroenterology*. 2007; 54(76): 1121-4

Shandall AA, Williams GT, Hallett MB, Young HL. Colonic healing: a role for polymorphonuclear leucocytes and oxygen radical production. *Br J Surg* 1986; 73(3): 225-8

Sharpe-Timms KL, Zimmer RL, Joliff WJ, Wright JA, Nothnick WB, Curry TE. Gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH-a) therapy alters activity of plasminogen activators, matrix metalloproteinases, and their inhibitors in rat models for adhesion formation and endometriosis: potential GnRH-a-regulated mechanisms reducing adhesion formation. *Fertil Steril* 1998; 69(5): 916-23

Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(6): 389-400

Shibuya M: Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 2001; 26(1): 25-35

Shimotsuma M, Kawata M, Hagiwara A, Takahashi T. Milky spots in the human greater omentum. Macroscopic and histological identification. *Acta Anat (Basel)* 1989; 136(3): 211-6

Shimotsuma M, Shields JW, Simpson-Morgan MW, Sakuyama A, Shirasu M, Hagiwara A, Takahashi T. Morpho-physiological function and role of omental milky spots as omentum-associated lymphoid tissue (OALT) in the peritoneal cavity. *Lymphology* 1993; 26(2): 90-101

Sievers S, Eckert M. Adhesion prophylaxis in surgical gynecology. *Fortschr Med* 1981; 99(1-2): 27-30

Sikkink CJ, de Man B, Bleichrodt RP, van Goor H. Auto-cross-linked hyaluronic acid gel does not reduce intra-abdominal adhesions or abscess formation in a rat model of peritonitis. *J Surg Res* 2006; 136(2): 255-9

Sims DE. Diversity within pericytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27(10): 842-6

Singh AK, Gudehithlu KP, Pegoraro AA, Singh GK, Basheerudin K, Robey RB, Arruda JA, Dunea G. Vascular factors altered in glucose-treated mesangial cells and diabetic glomeruli. Changes in vascular factors impair endothelial cell growth and matrix. *Lab Invest* 2004; 84(5): 597-606

Singh AK, Patel J, Litbarg NO, Gudehithlu KP, Sethupathi P, Arruda JA, Dunea G. Stromal cells cultured from omentum express pluripotent markers produce high amounts of VEGF, and engraft to injured sites. *Cell Tissue Res* 2008; 332(1): 81-8

Sinha S, Heagerty AM, Shuttleworth CA, Kielty CM. Expression of latent TGF-beta binding proteins and association with TGF-beta 1 and fibrillin-1 following arterial injury. *Cardiovasc Res* 2002; 53(4): 971-83

Sinha S, Nevett C, Shuttleworth CA, Kielty CM. Cellular and extracellular biology of the latent transforming growth factor-beta binding proteins. *Matrix Biol* 1998; 17(8-9): 529-45

Slavin J. The role of cytokines in wound healing. *J Pathol* 1996; 178(1): 5-10

Sortini D, Feo CV, Maravegias K, Carcoforo P, Pozza E, Liboni A, Sortini A. Role of peritoneal lavage in adhesion formation and survival rate in rats: an experimental study. *J Invest Surg* 2006; 19(5): 291-7

Sosa-Garrocho M, Macías-Silva M. El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β): Funciones y vías de transducción. *REB* 2004; 23(1): 3-11

Sporn M, Roberts AB. Autocrine secretion-10 years later. *Ann Int Med* 1992; 117(5): 408-14

Stylianou E, Jenner LA, Davies M, Coles GA, Williams JD. Isolation, culture and characterization of human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* 1990; 37(6): 1563-70

Sufiyarov IF. Experimental validation for the use of a film on the basis of modified hyaluronic acid for prevention of postoperative peritoneal adhesions. *Bull Exp Biol Med* 2007; 144(2): 269-71

Suzuki K, Lees M, Newlands GF, Nagase H, Woolley DE. Activation of precursors for matrix metalloproteinases 1 (interstitial collagenase) and 3 (stromelysin) by rat mast-cell proteinases I and II. *Biochem J* 1995; 305(Pt1): 301-6

Taipale J, Lohi J, Saarinen J, Kovanen PT, Keski-Oja J. Human mast cell chymase and leukocyte elastase release latent transforming growth factor-beta 1 from the extracellular matrix of cultured human epithelial and endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270(9): 4689-96

Takemori N, Hirai K, Onodera R, Saito N, Namiki M. Light and electron microscope study of splenoportal milky spots in New Zealand black mice: comparison between splenoportal milky spots and aberrant spleens. *J Anat* 1995; 186(Pt 2): 287-99

Talwar S, Jain S, Porwal R, Laddha BL, Prasad P. Free versus pedicled omental grafts for limb salvage in Buerger's disease. *Aust N Z J Surg* 1998; 68(1): 38-40

Ten Raa S, Van den Tol MP, Sluiter W, Hofland LJ, Van Eijck CH, Jeekel H. The role of neutrophils and oxygen free radicals in post-operative adhesions. *J Surg Res* 2006; 136(1): 45-52

Thaler K, Mack JA, Berho M, Grotendorst G, Wexner SD, Abramson SR. Coincidence of connective tissue growth factor expression with fibrosis and angiogenesis in postoperative peritoneal adhesion formation. *Eur Surg Res* 2005; 37(4): 235-41

Thompson JN, Paterson-Brown S, Harbourne T, Whawell SA, Kalodiki E, Dudley HA. Reduced human peritoneal plasminogen activating activity: possible mechanism of adhesion formation. *Br J Surg* 1989; 76(4): 382-4

Thompson JN, Whawell SA. Pathogenesis and prevention of adhesion formation. *Br J Surg* 1995; 82(1): 3-5

Tietze L, Elbrecht A, Schauerte C, Klosterhalfen B, Amo-Takyi B, Gehlen J, Winkeltau G, Mittermayer C, Handt S. Modulation of pro- and antifibrinolytic properties of human peritoneal mesothelial cells by transforming growth factor beta1 (TGF-beta1), tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin 1beta (IL-1beta). *Thromb Haemost* 1998; 79(2): 362-70

Tingstedt B, Isaksson K, Andersson E, Andersson R. Prevention of abdominal adhesions~present state and what 's beyond the horizon? *Eur Surg Res* 2007; 39(5): 259-68

Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991; 266(18): 11947-54

Tittel A, Treutner KH, Titkova S, Ottinger A, Schumpelick V. Comparison of adhesion reformation after laparoscopic and conventional adhesiolysis in an animal model. *Langenbecks Arch Surg* 2001; 386(2): 141-5

Treutner KH, Schumpelick V. Prevention of adhesions. Wish and reality. *Chirurg* 2000; 71(5): 510-7

Trimbos-Kemper TC, Trimbos JB, van Hall EV. Adhesion formation after tubal surgery: results of the eighth-day laparoscopy in 188 patients. *Fertil Steril* 1985; 43(3): 395-400

Tulandi T. Salpingo-ovariolysis: a comparison between laser surgery and electrosurgery. *Fertil Steril* 1986; 45(4): 489-91

Turner M, Chantry D, Katsikis T, Berger A, Brennan FM, Feldman M. Induction of interleukin 1 receptor antagonist protein by transforming growth factor beta. *Eur J Immunol* 1991; 21(7): 1635-9

Van der Krabben AA, Dijkstra FR, Nieuwenhuijzen M, Reijnen MM, Schaapveld M, Van Goor H. Morbidity and mortality of inadvertent enterotomy during adhesiotomy. *Br J Surg* 2000; 87(4): 467-71

Van der Lei B, Bleichrodt RP, Simmermacher RK, van Schilfgaarde R. Expanded polytetrafluoroethylene patch for the repair of large abdominal wall defects. *Br J Surg* 1989; 76(8): 803-5

Van Hinsbergh VW, Kooistra T, Scheffer MA, Hajo van Bockel J, van Muijen GN. Characterization and fibrinolytic properties of human omental tissue mesothelial cells. Comparison with endothelial cells. *Blood* 1990; 75(7): 1490-7

Van Vugt E, Van Rijthoven EA, Kamperdijk EW, Beelen RH. Omental milky spots in the local immune response in the peritoneal cavity of rats. *Anat Rec* 1996; 244(2): 235-45.

Veikkola T, Karkkainen M, Cleasson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 2000; 60(2): 203-12

Vernik J, Singh AK. Omentum: power to heal and regenerate. *Int J Artif Organs* 2007; Feb; 30(2): 95-9

Vilchis-Landeros MM, Juárez P, López-Casillas F. El papel fisiopatológico del TGF- β en las nefropatías de diversas etiologías: los inhibidores del TGF- β como agentes terapéuticos potenciales. *Gac Med Mex* 2003; 139(2): 126-34

Vineberg A. Revascularization of the right and left coronary arterial systems. Internal mammary artery implantation, epicardiectomy and free omental graft operation. *Am J Cardiol* 1967; 19(3): 344-53

Vural B, Cantürk NZ, Esen N, Solakoglu S, Cantürk Z, Kirkali G, Sökmensüer C. The role of neutrophils in the formation of peritoneal adhesions. *Hum Reprod* 1999; 14(1): 49-54

Wahi SM. Transforming growth factor beta (TGF- β) in inflammation: a cause and cure. *J Clin Immunol* 1992; 12(2): 61-74

Wahl SM. Transforming growth factor beta in inflammation: a cause and a cure. *J Clin Immunol* 1992; 12(2): 61-74

Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, Mc Cartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(16): 5788-92

Wakefield LM, Winokur TS, Hollands RS, Christopherson K, Levinson AD, Sporn MB. Recombinant latent transforming growth factor beta 1 has a longer plasma half-life in rats than active transforming growth factor beta 1, and a different tissue distribution. *J. Clin. Invest* 1990; 86(6): 1976-84

Wallwiener D, Meyer A, Bastert G. Adhesion formation of the parietal and visceral peritoneum: an explanation for the controversy on the use of autologous and alloplastic barriers? *Fertil Steril* 1998; 69(1): 132-7

Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994; 269(43): 26988-95

Waltz DA, Natkin LR, Fujita RM, Wei Y, Chapman HA. Plasmin and plasminogen activator inhibitor type 1 promote cellular motility by regulating the interaction between the urokinase receptor and vitronectin. *J Clin Invest* 1997; 100(1): 58-67

Walzog B, Scharffetter-Kochanek K, Gaeltgens P. Impairment of neutrophil emigration in CD18-null mice. *Am J Physiol* 1999; 276(5 Pt 1): G1125-30

Wang HB, Wang JT, Zhang L, Geng ZH, Xu WL, Xu T, Huo Y, Zhu X, Plow EF, Chen M, Geng JG. P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation. *Nat Immunol* 2007; 8(8): 882-92

Weibel MA, Majno G. Peritoneal adhesions and their relation to abdominal surgery. A post-mortem study. *Am J Surg* 1973; 126: 345-53

Whawell SA, Thompson JN. Cytokine-induced release of plasminogen activator inhibitor-1 by human mesothelial cells. *Eur J Surg* 1995; 161(5): 315-8

Whawell SA, Vipond MN, Scott-Coombes DM, Thompson JN. Plasminogen activator inhibitor 2 reduces peritoneal fibrinolytic activity in inflammation. *Br J Surg* 1993a; 80(1): 107-9

Whawell SA, Wang Y, Fleming KA, Thompson EM, Thompson JN. Localization of plasminogen activator inhibitor-1 production in inflamed appendix by in situ mRNA hybridization. *J Pathol* 1993b; 169(1): 67-71

Whitaker D, Papadimitriou J. Mesothelial healing: morphological and kinetic investigations. *J Pathol* 1985; 145(2): 159-75

Whitaker D, Papadimitriou JM, Walters M. The mesothelium: its fibrinolytic properties. *J Pathol* 1982; 136(4): 291-9

Wiczak HP, Grow DR, Adams LA, O'Shea DL, Reece MT. Pelvic adhesions contain sex steroid receptors and produce angiogenesis growth factors. *Fertil Steril* 1998; 69(3): 511-6

Wijffels JF, Hendrickx RJ, Steenbergen JJ, Eestermans IL, Beelen RH. Milky spots in the mouse omentum may play an important role in the origin of peritoneal macrophages. *Res Immunol* 1992; 143(4): 401-9

Wilkosz S, Epstein J, de Giorgio-Miller A, McLean W, Ireland G, Herrick S. Remodelling of adipose tissue during experimental omental adhesion formation. *Br J Surg* 2008; 95(3): 387-96

Wilkosz S, Ireland G, Khwaja N, Walker M, Butt R, de Giorgio-Miller A, Herrick SE. A comparative study of the structure of human and murine greater omentum. *Anat Embryol (Berl)* 2005; 209(3): 251-61

Wilson MS, Ellis H, Menzies D, Moran BJ, Parker MC, Thompson JN. A review of the management of small bowel obstruction. Members of the Surgical and Clinical Adhesions Research Study (SCAR). *Ann R Coll Surg Engl* 1999; 81(5): 320-8

Wipff PJ, Rifkin DB, Meister JJ, Hinz B. Myofibroblast contraction activates latent TGF- β 1 from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 2007; 179(6): 1311-23

Wodzinski MA, Bardhan KD, Reilly JT, Cooper P, Preston FE. Reduced tissue type plasminogen activator activity of the gastroduodenal mucosa in peptic ulcer disease. *Gut* 1993; 34(10): 1310-4

Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 1994; 370(6488): 341-7

Wu Z, Yang L, Cai L, Zhang M, Cheng X, Yang X, Xu J. Detection of epithelial to mesenchymal transition in airways of a bleomycin induced pulmonary fibrosis model derived from an alpha-smooth muscle actin-Cre transgenic mouse. *Respir Res* 2007; 8: 1

Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407(6801): 242-8

Yáñez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramírez-Huesca M, Domínguez-Jiménez C, Jiménez-Heffernan JA, Aguilera A, Sánchez-Tomero JA, Bajo MA, Álvarez V, Castro MA, del Peso G, Cirujeda A, Gamallo C, Sánchez-Madrid F, López-Cabrera M. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003; 348(5): 403-413

Yang AH, Chen JY, Lin JK. Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int* 2003; 63(4): 1530-9

Yarali H, Zahradka BF, Gomel V. Hyaluronic acid membrane for reducing adhesion formation and reformation in the rat uterine horn. *J Reprod Med* 1994; 39(9): 667-70

Yeo Y, Bellas E, Highley CB, Langer R, Kohane DS. Peritoneal adhesion prevention with an in situ cross-linkable hyaluronan gel containing tissue-type plasminogen activator in a rabbit repeated-injury model. *Biomaterials* 2007; 28(25): 3704-13

Yilmaz B, Aksakal O, Gungor T, Sirvan L, Sut N, Kelekci S, Soysal S, Mollamahmutoglu L. Metformin and atorvastatin reduce adhesion formation in a rat uterine horn model. *Reprod Biomed Online* 2009; 18(3): 436-42

Yuzbasioglu MF, Ezberci F, Imrek E, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Imrek S. The effect of intraperitoneal catalase on prevention of peritoneal adhesion formation in rats. *J Invest Surg* 2008; 21(2): 65-9

Zagorski J, Wahl SM. Inhibition of acute peritoneal inflammation in rats by a cytokine-induced neutrophil chemoattractant receptor antagonist. *J Immunol* 1997; 159(3): 1059-62

Zareie M, Fabbrini P, Hekking LH, Keuning ED, Ter Wee PM, Beelen RH, van den Born J. Novel role for mast cells in omental tissue remodeling and cell recruitment in experimental peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(12): 3447-57

Zetter BR. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med* 1998; 49: 407-24

Zhang H, Akman HO, Smith EL, Zhao J, Murphy-Ullrich JE, Batuman OA. Cellular response to hypoxia involves signaling via Smad proteins. *Blood* 2003; 101(6): 2253-60

Zhang QX, Magovern CJ, Mack CA, Budenbender KT, Ko W, Rosengart TK. Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis. *J Surg Res* 1997; 67(2): 147-54

Zhu H, Naito M, Umezu H, Moriyama H, Takatsuka H, Takahashi K, Shultz LD. Macrophage differentiation and expression of macrophage colony-stimulating factor in murine milky spots and omentum after macrophage elimination. *J Leukoc Biol* 1997; 61(4): 436-44

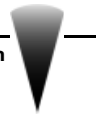
Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13(12): 4279-95

7. ANEXOS

7. ANEXOS

1. Gómez-Gil V, Pascual G, García-Honduvilla N, Rodríguez M, Buján J, Bellón JM.
Characterizing omental adhesions by culturing cells isolated from a novel in vivo
adhesion model. Wound Repair Regen 2009; 17(1): 51-61.

2. Gómez-Gil V, García-Honduvilla N, Pascual G, Rodríguez M, Buján J, Bellón JM.
Peritoneal adhesion formation and reformation tracked by sequential laparoscopy:
optimizing the time point for adhesiolysis. (Enviado a Surgery).



Characterizing omental adhesions by culturing cells isolated from a novel in vivo adhesion model

Verónica Gómez-Gil, PhD¹; Gemma Pascual, PhD¹; Natalio García-Honduvilla, PhD¹; Marta Rodríguez, PhD²; Julia Buján, MD¹; Juan M. Bellón, MD²

1. Department of Medical Specialities, Faculty of Medicine, and

2. Department of Surgery, Faculty of Medicine, University of Alcalá, Networking Research Centre on Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Madrid, Spain

Reprint requests:

Prof. J. M. Bellón, Department of Surgery,
Faculty of Medicine, University of Alcalá,
Ctra. Madrid-Barcelona, Km 33,600, 28871
Alcalá de Henares, Madrid, Spain.
Tel: 34 91 8854540;
Fax: 34 91 8854885;
Email: juanm.bellon@uah.es

Manuscript received: March 7, 2008

Accepted in final form: August 29, 2008

DOI:10.1111/j.1524-475X.2008.00441.x

ABSTRACT

Although it has been established that postoperative adhesions in the peritoneal cavity are the consequence of injury to the peritoneum, there is much controversy over the nature of the cells giving rise to this neotissue. Here, we establish a novel adhesiogenic model in the rabbit to analyze the phenotype and proliferation in vitro of cells comprising adhesion tissue seven days postsurgery. Adhesion-free omentum tissue was used as control. Cells derived from adhesions and from the control omentum were subcultured and characterized through immunofluorescence and Western blotting procedures to determine markers of cell differentiation and pluripotential, and viability and proliferation assays. Our findings indicate the existence of a mesenchymal population in the omentum revealed by markers of pluripotent cells with high angiogenic capacity. This population seems to be responsible for the adhesions formed in response to mesothelial damage. Depending on the local environment, mesenchymal cells are capable of in vivo differentiation towards at least two different cell phenotypes rendering two types of adhesions with clearly differentiated characteristics. One type of adhesion shows a highly vascularized adipose morphology containing cells differentiating into a vascular lineage. The other adhesions are fibrous with large amounts of collagen and comprised mainly of myofibroblasts conferring less compliance to this tissue.

Adhesions that form in the peritoneal cavity following surgery continue to be the primary cause of postoperative intestinal obstruction and may also produce infertility in women and chronic abdominal pain.¹ Patients who develop peritoneal adhesions often require several revision surgeries, which generates high economic costs for health-care systems and costs related to work days lost through sick leave.²

For certain factors intrinsic to the surgical procedure itself to induce the formation of adhesions, such as excessive tissue manipulation, infection or the implant of a foreign body, there has to be damage at the mesothelial level.³

When the peritoneum is injured, blood and an exudate of plasma proteins emerging from the damaged surface form a fibrinous deposit in the peritoneal cavity. This process is enhanced by post-trauma inflammation involving neutrophilic leukocytes in the first 24 hours. Macrophages also play an important role in the healing process by recruiting mesothelial cells to the site of injury as well as producing the cytokines platelet-derived growth factor, TGF- β and vascular endothelial growth factor, among others.⁴ Mesothelial cell deposition commences at 24 hours post surgery and finishes within 5–7 days.⁵ The cells that promote repair are those adjacent to the wound site, stem cells and cells circulating free in the peritoneum.^{6,7} In addition, fibrin deposited at the wound site also has the

function of repairing tissue. The viscous nature of the fibrinous exudate determines that it may adhere to adjacent intra-abdominal structures. During the initial days after tissue injury, this adhering role is reversed and the exudate then undergoes enzyme degradation following the local release of fibrinolytic substances. However, when this fibrinolysis fails or is insufficient, then as part of the wound healing response, the fibrin deposit triggers a tissue repair

α -SMA	α -smooth muscle actin
AA	Adipose adhesions
BSA	Bovine serum albumin
CFSE	Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole-dihydrochloride
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FA	Fibrous adhesions
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	Forward scatter
MEM	Minimal essential medium
PBS	Phosphate-buffered saline
PODXL	Podocalyxin-like protein-1
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SSC	Side scatter
SSEA-4	Stage-specific embryonic antigen-4
TGF- β	Transforming growth factor- β

process that extends to the fibrin network. In the first 5 days, this network is invaded through the proliferation of fibroblasts, which replace the fibrin with other components of the extracellular matrix, mostly collagen. This is how the adhesion forms. Once this process has taken place it is considered that the adhesion is irreversible. Thus, during the first few days after injury, the balance between fibrin deposition and its degradation is pivotal for the development of adhesions and it is sometime between 5 and 7 days following surgery that the adhesion formation process is consolidated.

Any disequilibrium between the formation of fibrin and fibrinolysis is therefore a determining factor for an adhesion to develop, and the mesothelium has to be intact for this balance to be maintained. When fibrinolytic activity falls, more adhesions form.⁸

The design of an efficient method of preventing adhesions requires an exhaustive understanding of the etio-pathogenesis of adhesion formation as well as of the cell types responsible for their appearance and development.⁹ Attempts to examine adhesion formation in humans have been hindered by the difficulty in finding adhesion tissue of similar maturity produced by a single pathology for adequate comparisons. For this reason, scientists have opted for the use of animal models.

Our model of experimental adhesions in the rabbit uses a biomaterial placed over the parietal peritoneum, which once positioned does not provoke trauma yet induces rapid adhesion formation.

The origin of the cells involved in adhesion formation has been a long-standing subject of debate¹⁰ despite a lack of reports in the literature of studies performed on cultures of cells obtained from adhesion tissue.

The aim of the present study was to examine in our experimental model the proliferation ratio and phenotypic markers shown *in vitro* by cells obtained from adhesion tissue and to compare these markers with those exhibited by mesothelial cells harvested from the intact omentum.

MATERIALS AND METHODS

Experimental adhesion model

The experimental animals used were 10 male White New Zealand rabbits weighing 3,000–3,200 g, caged under constant conditions of light and temperature. The study was approved by the Committee for Animal Care and Use of the University of Alcalá. All procedures were performed in accordance with EU animal care guidelines (EEC 2871-22 A9), assuring the humane treatment of research animals.

Animals were anesthetized with a mixture of ketamine hydrochloride (70 mg/kg; Ketolar[®], Parke-Davis, Spain); diazepam (1.5 mg/kg; Valium[®], Roche, Spain); and chlorpromazine (1.5 mg/kg; Largactil[®], Rhone-Poulenc, Spain) administered intramuscularly.

Using a sterile surgical technique, a longitudinal laparotomy was performed along the midline. To the left of this incision, a 5 cm × 3.5 cm polypropylene mesh was placed on the parietal peritoneum and fixed at the corners using four transmural stitches of 4/0 polypropylene (Tyco, Madrid, Spain). The laparotomy was closed by a running 4/0 polypropylene suture. A week later, the animals were rela-

parotomized to obtain the neoformed adhesion tissue produced.

Samples were taken of the adhesions formed between the animal's omentum and the polypropylene mesh. Fragments of omentum free from adhesions were also harvested some distance from the mesh. This omental tissue served as the control.

Histological study

For light microscopy, specimens were fixed in Bouin's fluid, embedded in paraffin and cut using a microtome (Microm, Barcelona, Spain) into 5- μ m sections and stained with Masson's trichrome (Goldner-Gabe). These sections were then examined under a Zeiss Axiophot light microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Immunohistochemical analysis

For the immunohistochemical analysis, adhesion tissue and omental specimens were frozen at -80°C , embedded in Tissue-Tek O.C.T. embedding compound (Sakura Finetek Europe B.V, Zoeterwoude, The Netherlands) and cut in a cryostat (Leica CM1850, Leica Microsystems, Nussloch, Germany) or fixed in Bouin's fluid or 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin to obtain 5- μ m-thick sections. We used the following antibodies: anti- α -smooth muscle actin (α -SMA) (clone 1A4), anti-myosin (smooth) (clone HSM-V), anti-desmin (clone DE-U-10) and anti-CD31 (clone WM-59) (Sigma, St. Louis, MO); anti-cytokeratin-5 (RCK103, Abcam, Cambridge, UK), anti-cytokeratin-18 (RGE53, Abcam) and goat anti-Oct-3/4 (R&D Systems, Vitro S.A., Madrid, Spain). As secondary antibodies, rhodamine red-conjugated donkey anti-goat IgG (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., West Grove, PA), or anti-mouse goat IgG antibody conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) or to biotin (Sigma) were used. The sections were then examined under a Zeiss Axiophot light microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) or under a confocal microscope (Leica TCS-SP5).

Isolating and culturing cells from the omental adhesions

The specimens of adhesion tissue were dissected and mechanically disaggregated under sterile conditions to form small explants. These explants were transferred to 25-cm² culture flasks, to which 1 mL of culture medium (Amniox-MAX[™]; Invitrogen, Barcelona, Spain) had been added. The culture flasks were then incubated in a vertical position at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 1 hour to promote the adhesion of the explants to the culture surface. Next, the flasks were positioned horizontally to allow cell expansion from the small cultured explants. The culture flasks were then incubated under the previous conditions until a state of semiconfluence (75–90% of the surface covered). At this time, the cells were treated with 1.5 mL trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 0.5% (Invitrogen) and subcultured at a 1:4 ratio. Cells from this passage were subjected to cell viability and proliferation tests, and characterized through immunofluorescence and Western blotting procedures.

Isolating and culturing mesothelial cells from the adhesion-free omentum

Fragments of omentum of some 20–25 g obtained from the experimental animals were transported to the laboratory in minimum essential medium (MEM, Invitrogen), where they were processed in sterile conditions. First the tissue was washed three times in MEM to remove any blood cells adhered during the dissection process and then incubated in a 0.1% collagenase type I suspension (Worthington, Iberlabo, Madrid, Spain) in MEM in an agitation bath at 37 °C for 20 minutes. The tissue was then washed in 20 mL of MEM and the wash added to the collagenase suspension containing the mesothelial cells. This cell suspension was centrifuged at 250 × g for 10 minutes. Following centrifugation, the supernatant was discarded and the remaining pellet was resuspended in 10 mL of basal MEM and centrifuged again under the same conditions. After washing three times, the cells were resuspended in 3 mL of culture medium (AmnioMAX™) and transferred to culture flasks of 25 cm² surface area. The flasks were incubated at 37 °C in a CO₂ atmosphere until the cells reached semiconfluence when they were treated with 1.5 mL trypsin–EDTA 0.5% and subcultured at a 1 : 4 ratio.

Cell proliferation and viability

Cell viability

For each cell population, 5×10^4 cells were transferred to a 25-cm² flask culture surface and examined at 1, 2, 3, 4 and 8 days.

To determine the number of viable cells, the cells were diluted in 0.1% trypan blue solution at a ratio of 1 : 9 (v/v) and then counted under the light microscope in a Neubauer chamber. Viable cell concentrations were estimated as the mean number of cells present in four microscopy fields of 0.1 mm² area.

Flow cytometry

The cells were treated with 1.5 mL trypsin–EDTA 0.5%, centrifuged at 1,050 r.p.m. for 10 minutes and resuspended in a phosphate-buffered saline (PBS)/bovine serum albumin (BSA) solution preheated to 37 °C until a final concentration of 10^6 cells/mL. Next, 2 µL of a 5 mM CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) stock solution (CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit—C34554, Molecular Probes, Invitrogen) was added per milliliter of cell suspension. In these conditions, the cells were incubated in the dark at 37 °C for 10 minutes. After this time, labeling was stopped by the addition of 5 mL of ice-cold complete culture medium. The cell suspension was incubated for 5 minutes on ice and centrifuged for 10 minutes at 250 × g. After washing three times, the pellet was resuspended in fresh medium (AmnioMAX™) and the cells seeded in culture flasks of 25-cm² culture surface area (10^5 cells/flask). The follow-up times established were: the moment of labeling or baseline, and 1, 2, 3, 4 and 5 days. The cells were examined in a flow cytometer (FACScalibur, Becton Dickinson, Madrid, Spain) using an argon laser at an excitation wavelength of 488 nm and emission

filters appropriate for fluorescein. Propidium iodide was used to discriminate between viable and dead cells.

Characterizing the cell population

The cells from the adhesion tissue and the mesothelial cells from the omentum were characterized by immunofluorescence assays or by peroxidase-labeled avidin–biotin procedures using anti- α -SMA, anti-vimentin, anti-myosin (smooth), anti-desmin, and anti-CD31 antibodies (Sigma). To this end, cells from the first subculture were seeded on sterile coverslips and fixed for 30 minutes in Bouin's fluid, rinsed for 10 minutes in 70° ethanol and washed three times in PBS 1×. We also used anti-cytokeratin-5 (RCK103, Abcam) and anti-cytokeratin-18 (RGE53, Abcam) antibodies on cells fixed in methanol at –20 °C for 20 minutes, including a permeabilization step before incubating with the primary antibody (0.5% Triton X-100, 0.5% BSA, 1% serum, 45 minutes, room temperature). As secondary antibody, we used an anti-mouse goat IgG antibody conjugated to FITC or to biotin (Sigma) diluted in PBS 1× pH 7.6. The chromogenic substrate in avidin–biotin procedure contained diaminobenzidine. Nuclei were counterstained with 4',6-diamino-2-phenylindole-dihydrochloride (DAPI) or Carazzi hematoxylin.

We identified markers characteristic of embryonic stem cells or undifferentiated, pluripotent cells in cells isolated from the postsurgery adhesions and in the mesothelial cells of the omentum both fixed in paraformaldehyde 4% for 20 minutes at room temperature according to the labeling kit's instructions. The antibodies employed were: goat anti-Oct-3/4, mouse anti-CD9 (clone 209306), mouse anti-E-cadherin (clone 180224), mouse anti-stage-specific embryonic antigen-4 (anti-SSEA-4) (clone MC-813-70) and mouse anti-podocalyxin-like protein-1 (anti-PODXL) (GCTM antigen, clone 222328) (R&D Systems, Vitro S.A.). As secondary antibodies, we used rhodamine red-conjugated donkey anti-goat IgG or rhodamine red-conjugated donkey anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.).

Double-labeling assays were performed using the antibodies described above. Cells were first incubated with BSA 0.1%, 10% fetal bovine serum in PBS 1× at room temperature for 45 minutes. Next, they were incubated with the primary antibody (10 µg/mL in PBS, 1% BSA, 10% FBS) for 30 minutes at 37 °C. This was followed by three 5-minutes washes in PBS 1× and incubation for 30 minutes at 37 °C with the secondary FITC-conjugated anti-mouse goat IgG antibody (1/100, Sigma) diluted in PBS 1×, pH 7.6. After three 5-minutes washes in PBS 1×, the samples were immersed in PBS overnight at 4 °C. The samples were blocked with 0.1% Triton X-100, 1% BSA, 10% FBS when the second primary antibody was Oct-3,4 and with 1% BSA, 10% FBS in PBS 1× for the remaining antibodies. Incubation with the secondary antibody was conducted at 37 °C for 30 minutes and, in each case, the concentration used was 10 µg/mL diluted in 1% BSA, 10% FBS in PBS. After incubation with the second primary antibody and three 5-minutes washes, incubation with the secondary antibody was performed for 30 minutes at 37 °C. The antibody rhodamine red-conjugated donkey anti-goat IgG was used when the second primary antibody was Oct-3,4 and rhodamine red-conjugated donkey anti-

mouse IgG for the rest of the antibodies. Both secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) were used at a dilution of 1 : 200. Following incubation the samples were subjected to three 5-minutes washes in PBS 1 ×. Nuclei were counterstained with DAPI.

In all cases, negative controls were prepared by replacing the primary antibody with a solution of PBS 1 ×. Differences in the proportions of cells scoring positive for a given antibody among the different cell types were analyzed using the Mann–Whitney *U*-test (GraphPad Prism 4 software for Windows XP).

Western blotting

Total intracellular contents of the proteins PODXL, desmin and anti- α -smooth muscle actin were determined in cell cultures by Western blotting.

For Western blot analysis, 2×10^5 cells were seeded in 25-cm² flasks. Once the cells were confluent, they were lysed at 4 °C in the extraction buffer [0.5 M Na₂HPO₄, 8 M urea, 10% Nonidet NP-40 (Amresco, Solon, OH), 0.2 M EDTA and 4% protease inhibitor cocktail (Roche, Penzberg, Germany)]. The resultant solutions were centrifuged at 21,000 × *g* for 10 minutes at 4 °C and the supernatants recovered in clean Eppendorf tubes. Proteins were separated by electrophoresis on a 12% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel under reducing conditions. Equal aliquots (10 μ L) containing approximately 15 μ g of protein were diluted in sample buffer (50 mM Tris-base, pH 6.8, containing 50% glycerol, 0.125% bromophenol blue, 15% SDS in the presence of 10% 2- β -mercaptoethanol) and heated at 100 °C for 5 minutes before loading. After 2 hours of electrophoresis at 100 V, the separated proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA) and subjected to 210 mA for 2 hours at room temperature. The membranes were blocked overnight at 4 °C with 5% powdered milk in PBS using 0.05% Tween 20. The following primary antibodies were applied to the blotted membranes for 2 hours at room temperature: anti-PODXL (R&D Systems, Vitro S.A.), anti-desmin and anti- α -smooth muscle actin (Sigma). The secondary antibody, anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (Sigma), was incubated with the membranes for 1.5 hours at room temperature. The blots were developed using the SuperSignal Westpico Chemiluminescent kit (Pierce, Rockford, IL). Positive bands were visualized on X-ray film. Mouse anti- β -actin antibody (Calbiochem Inc., La Jolla, CA) was used as a loading control. The intensities of PODXL, α -SMA and desmin were normalized to those of the β -actin bands. Results were expressed as the mean \pm SE of ten samples per group. Statistical analysis was performed using the Student's *t*-test (GraphPad Prism 4 for windows XP).

RESULTS

During the study period no animal died or suffered any type of lesion that could affect the results.

Following relaparotomy (7 days) we could see that in this first week, adhesions were composed of a highly vascularized connective tissue in the process of maturing and specializing (granulation tissue) (Figure 1).

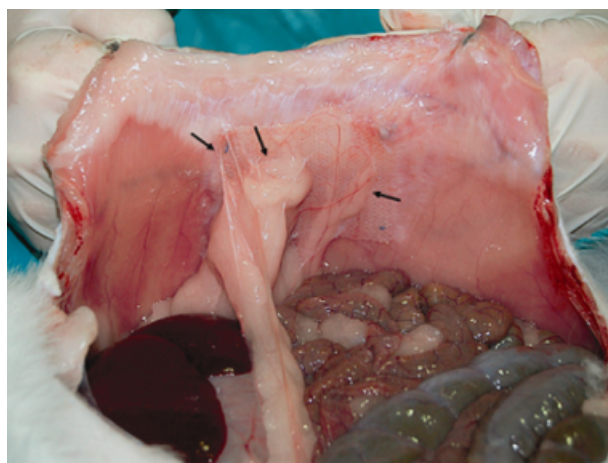


Figure 1. Adhesions formed between the host omentum and the polypropylene mesh (→) 7 days after mesh placement.

Tissue sections

Histological examination of the adhesion tissue revealed areas that were highly cellular with variable amounts of collagen, interspersed with adipose areas. According to the relative proportions of connective to adipose tissue we were able to distinguish two types of adhesion in the different samples obtained, which we designated *adipose adhesions* (AA), and *fibrous adhesions* (FA). The former type showed a predominance of adipose and reticular connective tissue, and a high density of blood vessels revealed by CD31, α -SMA and myosin staining (Figure 3). In contrast, FA had large fibrous, poorly vascularized zones with dense collagen deposits. The expression of CD31, α -SMA and myosin revealed the presence of microvessels and the lack of larger vessels such as those seen in AA. FA presented some areas of isolated fibroblast-like cells positive for α -smooth muscle actin and negative for desmin, suggesting a myofibroblast phenotype (Figure 3).

The control adhesion-free omentum always appeared as mesothelial tissue embedded in mature adipose tissue, which was scarcely cellular and highly vascularized (Figure 2). This mesothelium showed positivity for cytokeratin-5 (Figure 3) but not for cytokeratin-18.

Immunostaining for the stem cell transcription factor Oct-3/4 revealed the presence of pluripotent embryonic stem cells (Figure 3).

Isolating the adhesion tissue cells

Twenty-four hours after placing the explants of omental or adhesion tissue in culture, we could observe the cell expansion process characterized by cell migration and colonization of the culture surface. Once the adhesion-derived cells had reached confluence, the monolayer of typical mesothelial cobblestone appearance was similar to that formed by the cells from the control omental tissue (Figure 4). During the course of subculture, however, fibroblastoid-like cells appeared and proliferated to colonize large areas, which limited and encapsulated the mesothelial type cells. After the fifth passage, most of the cell populations were of a mesenchymal or fibroblastic morphology.

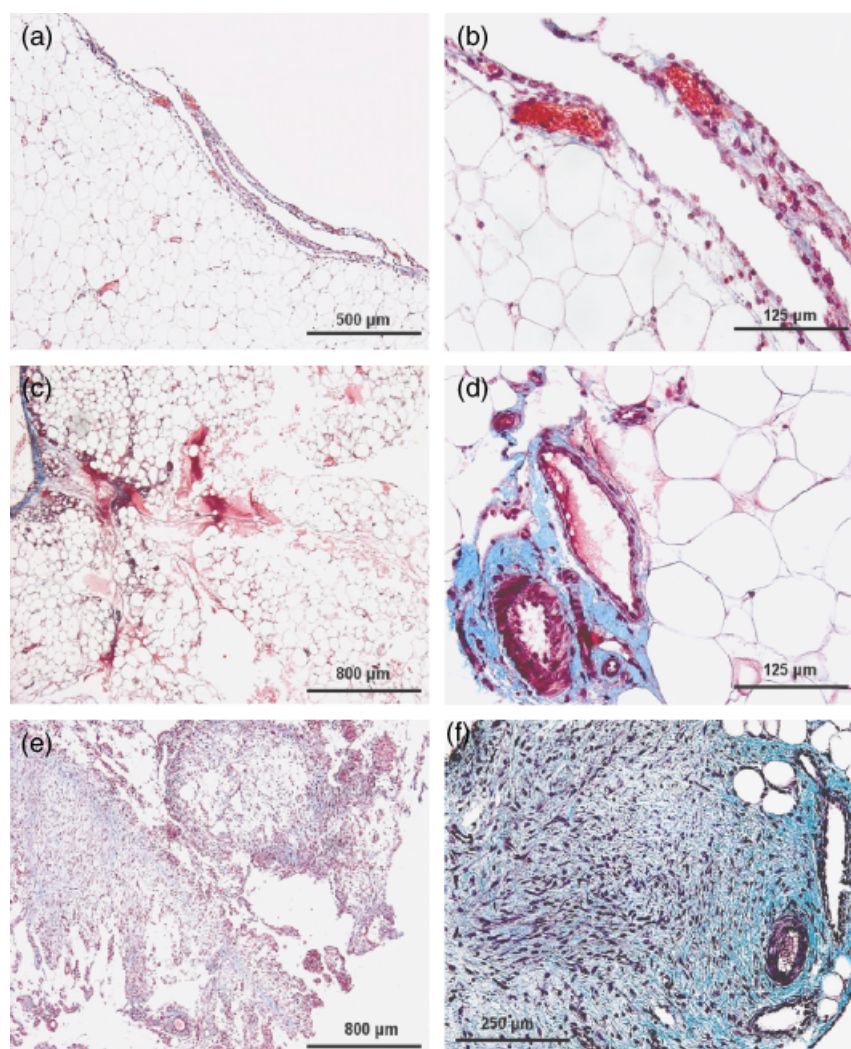


Figure 2. Micrographs showing the different types of adhesions stained using Masson's trichrome: (A, B) Sections of omentum showing its adipose and highly vascularized appearance (A, original magnification $\times 80$; B, original magnification $\times 320$); (C, D) Adhesions of the adipose type (C, original magnification $\times 50$; D, original magnification $\times 320$); (E, F) Fibrous type adhesions (E, original magnification $\times 50$; F, original magnification $\times 160$).

Cell proliferation and viability

The trypan blue exclusion method revealed a significantly greater proliferative capacity (number of viable cells) of the cells from the adhesion tissue ($p < 0.05$) than that shown by the cells of the adhesion-free omentum. This difference was not so evident when we compared cells from the two types of adhesion (AA and FA) (Figure 5).

After 48 hours of culture, the number of viable adhesion tissue-derived cells was from 3- to 6-fold higher to the number of viable omentum-derived cells. Cells cultured from the FA showed a greater rate of proliferation until the third culture day ($p < 0.05$), at which time the growth rate diminished slightly. In contrast, a considerable increase in the number of proliferating AA-derived cells was observed on the fourth day of culture compared with the FA- or omentum-derived cells ($p < 0.01$).

Our flow cytometry results (Figure 6) were consistent with the differences in proliferation rates observed using trypan blue between cells derived from adhesions and those from the omentum. Given that cells show a drop in fluorescence intensity depending on the number of divisions they un-

dergo, our results indicate that after two days of culture the cell population in the adhesion tissue had undergone a mean of three cell divisions and that by the end of the 5-day study period the cells had divided 6 times on average. For the omentum-derived cells, however, not one cell division on average had been completed by the end of the study period.

Characterizing the mesothelial cells of the omentum

In the first subculture, all the omentum-derived cells expressed the surface hemangioblast marker PODXL (Figure 7), which would explain the high vasculogenic capacity of this cell type given its hematopoietic and endothelial potential. The epithelial nature of these cells was revealed by their expression of E-cadherin and cytokeratin-5, while only around 3% expressed cytokeratin-18 (mature cytokeratin): 10.8% of the population expressed the antigen CD9, which is characteristic of mesenchymal stem cells, B cells, platelets, and microvascular endothelial cells. However, most of the cells of this population did not express the specific endothelial marker CD31 (Table 1).

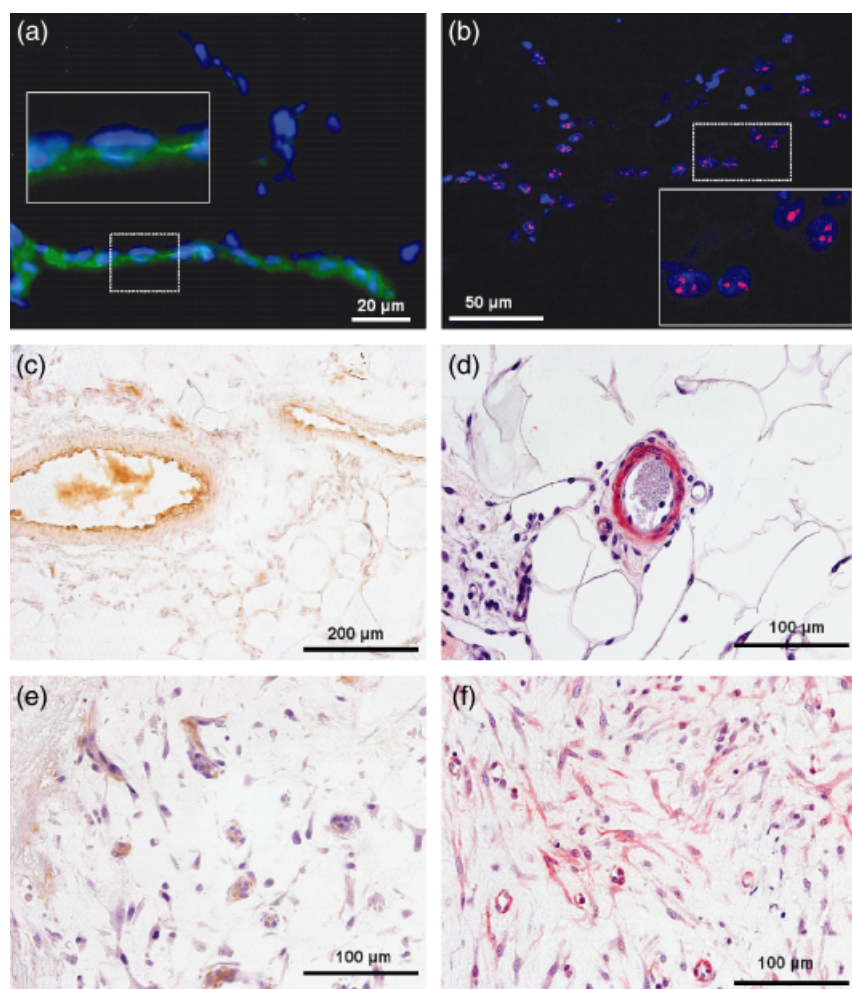


Figure 3. Immunohistochemical staining in tissue sections: Omentum—(A) cytokeratin-5 (original magnification $\times 1000$); Adipose adhesions—(B) Oct 3/4 (original magnification $\times 630$), (C) CD31 (original magnification $\times 200$); (D) myosin (original magnification $\times 400$); and fibrous adhesions (E) CD31 (original magnification $\times 400$); (F) α -smooth muscle actin (original magnification $\times 400$).

Adhesion to the substrate was efficient as revealed by the expression of vimentin. The lack of markers, such as myosin and desmin, indicated their distance from the muscle lineage (Table 1).

Characterizing the cells derived from adhesions

When we cultured the cells from the adhesion tissue, their cell phenotype was found to depend on their histological morphology.

In populations obtained from adhesions that were mainly of the adipose type (AA), we found that 21% of the cells were positive for mesenchymal markers (CD9, desmin) committed to the muscular-vascular cell line and 68% were positive for the smooth muscle cell marker myosin (Figure 8). These findings, taken together with the proportion of cells positive for CD31 (22.6%) are consistent with the highly vascularized connective tissue found in the AA. The proportion of cells expressing E-cadherin was intermediate between those observed in the control omentum and in the FA (46%) (Figure 9).

The cells derived from the more FA showed a clear myofibroblastic phenotype (100% were positive for α -

SMA and negative for desmin, myosin and CD9) (Figure 8). We observed a large reduction in the proportion of cells positive for E-cadherin (17.5%) (Figure 9) and SSEA-4 (67.1%) with respect to the adhesion-free omentum control. None of the adhesion-derived cells, AA or FA, expressed PODXL (Table 1), yet they did show CD31 (19.6%), probably corresponding to cells of the microvessels observed in tissue (Figure 3).

Practically all the omentum cells (96.2%) expressed SSEA-4 (Figure 7), characteristic of pluripotent, or embryonic, stem cells while this marker was expressed in lower proportions in the adhesion-derived cells (53% of the AA and 67% of the FA), although these differences failed to reach significance. The transcription factor Oct-3/4 required to maintain the pluripotential and self-renewal capacity of stem cells appeared in 90–100% of all the cell populations analyzed (Table 1) (Figure 7).

Western blotting

We determined the markers podocalyxin, desmin, and α -smooth muscle actin in the three different cell populations. Podocalyxin is an ~ 140 kDa protein expressed in kidney

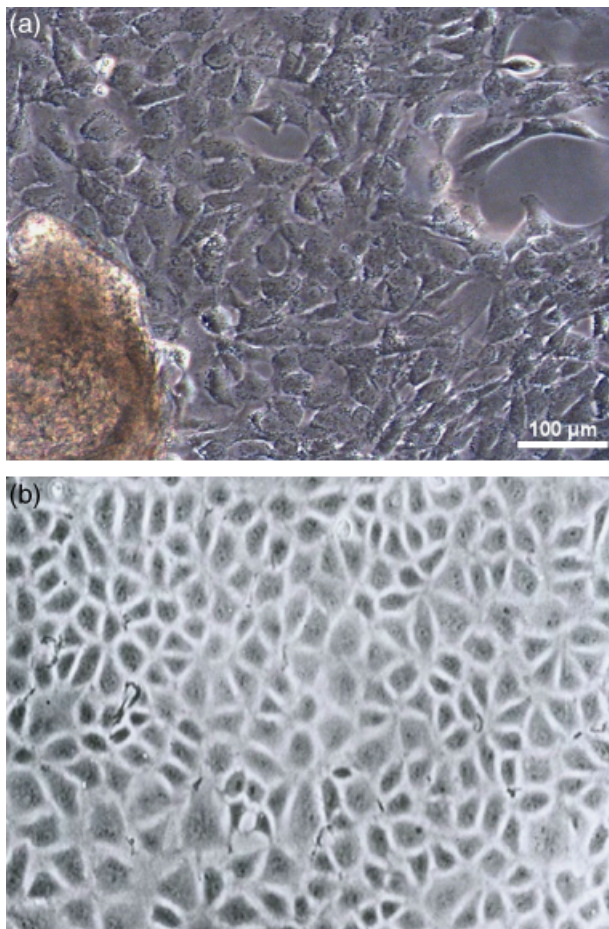


Figure 4. (A) Image showing the expansion of cells from the adhesion tissue explants. (B) Adhesion-derived cells from the first subculture of typical mesothelial morphology. Original magnification $\times 200$. Scale bar = $100\ \mu\text{m}$ (shown in A).

podocytes as well as on the surface of the vascular endothelium, mesothelial cells, megakaryocytes and hematopoietic progenitors. For the cells derived from the omentum, we detected a 140 kDa band whose expression was significant with respect to that corresponding to the adhesion-derived cells, which was practically null. Expression levels of desmin (50–55 kDa) were significantly higher ($p < 0.05$) for the AA compared with the omentum-derived cells. Significant differences with respect to omentum-derived and AA-derived cells ($p < 0.01$) were also detected for the FA in terms of α -smooth muscle actin expression (42 kDa). In contrast, the difference in the levels of this marker expressed in the omentum-derived and AA-derived cells was not significant ($p > 0.05$) (Figure 10).

In general, our Western blot results confirmed those of the immunofluorescence assays. Podocalyxin seems to be a marker of the mesothelial cells of the omentum whereas it was practically absent from the other two cell populations. Cells from the adipose-type adhesions were mostly characterized by their high desmin expression while in the population of fibrous adhesion-derived cells, α -smooth muscle actin was intensely expressed as the most distinguishing marker.

DISCUSSION

By isolating and expanding cells derived from adhesions, we were able to observe the existence of a mesenchymal cell population, which was highly sensitive to local environmental factors and responsible for the formation of two types of adhesions, adipose and fibrous.

Several of the findings of our study support the role of this cell population in the formation of adhesions. The first of these was a greater proliferative capacity of the adhesion-derived compared with the omentum-derived control cells. One of the main features of mesenchymal cells is their capacity for proliferation when appropriately stimulated. Thus, the cells derived from the adhesions showed a proliferation rate that was significantly higher compared with the cells from the undamaged, or unstimulated, omentum.

The second finding is related to cell differentiation into different phenotypes. The first subculture is ideal for

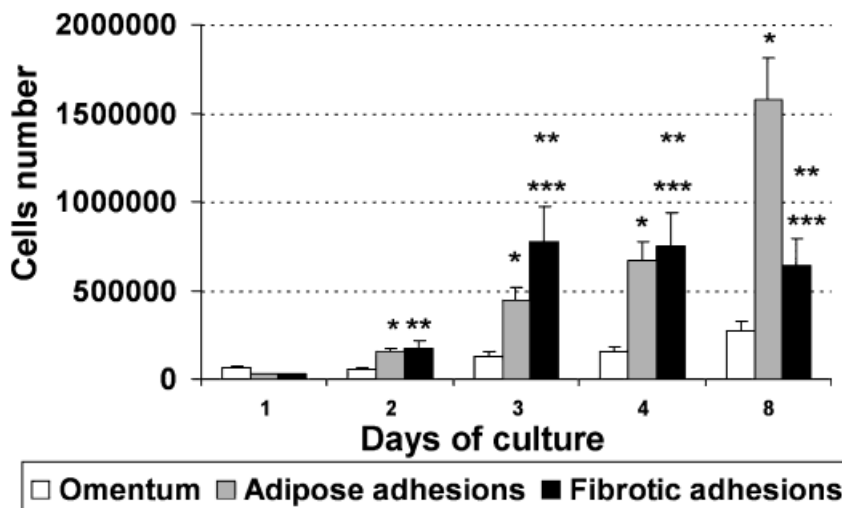


Figure 5. Cell proliferation assay. A rapid increase is produced in the number of viable cells when adhesion-derived cells are compared with adhesion-free omentum-derived cells ($n=10$). *Differences significant for omentum-derived vs. adipose adhesion-derived cells; $p < 0.05$. **Differences significant for omentum-derived vs. fibrous adhesion-derived cells; $p < 0.05$. ***Significant differences for adipose adhesion-derived vs. fibrous adhesion-derived cells; $p < 0.05$.

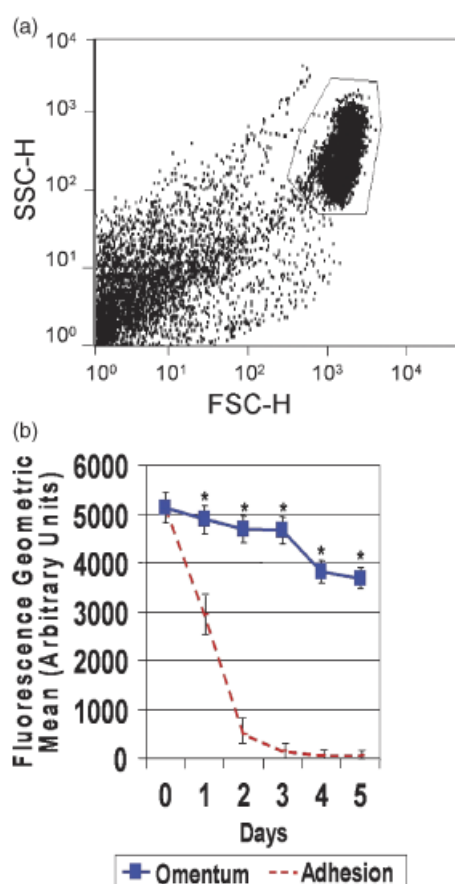


Figure 6. Flow cytometry using carboxyfluorescein diacetate succinimide ester tracer. (A) Dot plot of side scatter reflecting cell granularity (SSC) against forward scatter related to cell size (FSC) for adhesion-derived cells cultured for two days. (B) Proliferation rates of adhesion-derived cells compared with omentum-derived cells ($n=10$) ($*p < 0.001$). Graph showing fluorescence geometric mean (arbitrary units) vs. days.

identifying a mesothelial cell phenotype. Thus, in the initial subcultures of cells isolated from both the adipose and FA, we observed a remnant population of cells that expressed markers of epithelial cells (E-cadherin and cytokeratins) yet showed the same cobblestone appearance as the cultures of mesothelial cells from the control omentum. The low proportions of cells positive for cytokeratin-18 (a marker of differentiated mesothelial cells) detected in the three cell populations analyzed seem to be the consequence of the culture medium used, because in preliminary studies (data not shown) in which mesothelial cells derived from omentum were cultured in M199 medium, we were able to detect this marker in the entire cell population.

The cell morphology of the cells derived from adhesion tissue was not stable during successive cultures. After the fifth passage, cells of fibroblastoid morphology started to become dominant. This was also observed in the control omentum-derived cell population. This similar behavior in culture suggests that both adhesion tissue types arose from the same progenitor cell pool, which is also present in omentum-derived cells.

Transformation from a mesothelial-like to a fibroblastoid-like cell population has evoked several interpretations in the past. This change in cell phenotype has been attributed to contamination¹¹ leading to fibroblast growth or to transdifferentiation from mesothelial to mesenchymal cells in response to exogenous TGF- β and observed during peritoneal dialysis.¹² Some authors have even directly considered the cells comprising adhesions as fibroblasts.¹³ We think that this phenotypic change is due to the renewal of cell populations in the different passages. Thus, owing to their faster growth compared with the differentiated mesothelial cells, the mesenchymal cells of the adhesions and those serosal mesenchymal cells contaminating the mesothelial cell population isolated from the omentum become the main population in the cultures. However, the presence of cells that are positive for E-cadherin and for α -smooth muscle actin suggests that the cells were in a process of EMT (epithelial-to-mesenchymal transition) upon their isolation from the tissue. This transition would then

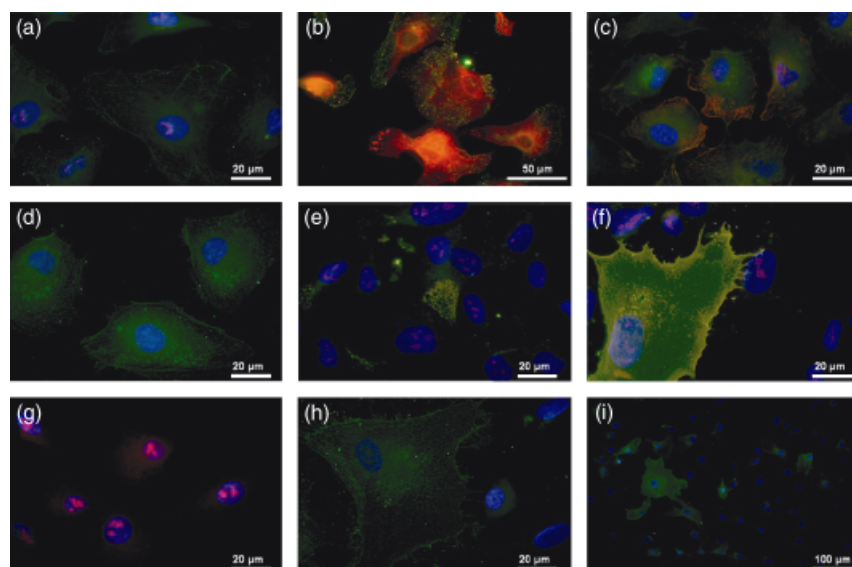


Figure 7. Expression of embryonic markers: (A) Omentum-derived cells. E-cadherin (green) + Oct 3/4 (red) (original magnification $\times 1000$); (B) Omentum-derived cells; E-cadherin (green) + stage-specific embryonic antigen-4 (SSEA-4) (red) (original magnification $\times 630$); (C) Omentum-derived cells. CD-9 (green) + E-cadherin (red) (original magnification $\times 1000$); (D) Omentum-derived cells. Podocalyxin-like protein-1 (green) (original magnification $\times 1000$); (E) Fibrous adhesion-derived cells. E-cadherin (green) + Oct 3/4 (red) (original magnification $\times 1000$); (F) Fibrous adhesion-derived cells. SSEA-4 (green) + Oct 3/4 (red) (original magnification $\times 1000$); (G) Adipose adhesion-derived cells. Oct 3/4 (red) (original magnification $\times 1000$); (H) Adipose adhesion-derived cells. CD-9 (green) (original magnification $\times 1000$); (I) Adipose adhesion-derived cells. SSEA-4 (green) (original magnification $\times 200$).

Table 1. Percentages of cells positive for the different markers during the first subculture

Antibody	Omental Cells (%)	Adipose Adhesion (%)	Fibrotic Adhesion (%)
Oct-3/4	100	91 ± 5.1	100
SSEA-4	96.2 ± 1.8*†	53 ± 13.1	67.1 ± 14.0
PODXL	100*†	0	0
CD9	10.8 ± 5.6*†	21 ± 7.9‡	0
E-cadherin	94 ± 4.7*†	46 ± 21.7‡	17.5 ± 2.7
CK5	83.6 ± 14.4*†	3.5 ± 0.3‡	29.7 ± 7.8
CK18	3.0 ± 0.2*†	11 ± 1.6‡	0%
Vimentin	100	100	100
α-SMA	43.3 ± 5.9‡	53 ± 3.4‡	100
Desmin	0	21 ± 2.3	0
Myosin	0*	68 ± 7.3‡	0
CD31	0.6 ± 0.5	22.6 ± 1.3	19.6 ± 0.2

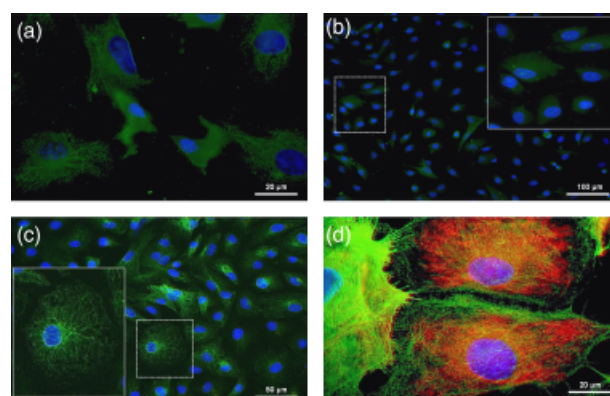
Values indicate percentage ± SD.

*Differences significant for omentum-derived vs. adipose adhesion-derived cells; $p < 0.05$.

†Differences significant for omentum-derived vs. fibrous adhesion-derived cells; $p < 0.05$.

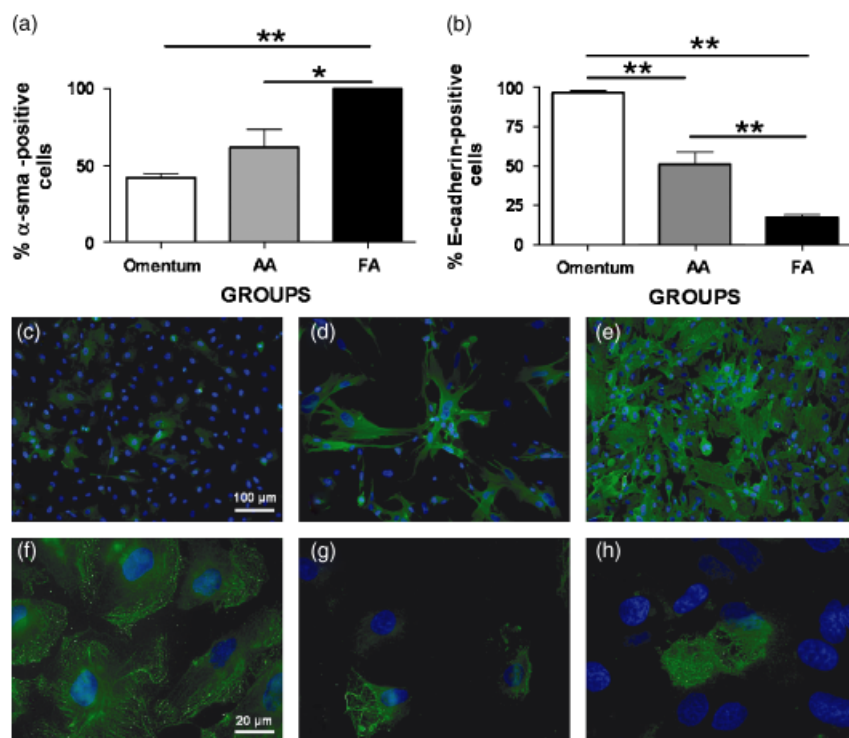
‡Significant differences for adipose adhesion-derived vs. fibrous adhesion-derived cells; $p < 0.05$.

PODXL, podocalyxin-like protein-1; SSEA, stage-specific embryonic antigen-4; α-SMA, α-smooth muscle actin.

**Figure 8.** Expression of differentiation markers in cells derived from adipose adhesions: (A) Desmin, original magnification × 1000, and (B) myosin, original magnification × 200; Omentum: (C) cytokeratin-5, original magnification × 400; or fibrous adhesions: (D) vimentin (red) and α-smooth muscle actin (green) original magnification × 1000.

continue in vitro. Both these findings, the epithelial-to-mesenchymal transition of cells and the faster growth of mesenchymal cells, are likely to have contributed to the phenotypic changes observed in the cell cultures.

The third finding supporting mesenchymal cells as the cell source for adhesion formation was the persistence of embryonic markers. The undifferentiated state of the mesenchymal cell can be currently revealed through the expression of transcription factors or cytoplasmic proteins that maintain their totipotential. In our model, high expression levels of SSEA-4 and Oct-3/4 were observed in the

**Figure 9.** Percentage of cells expressing: (A) α-smooth muscle actin (α-SMA) and (B) E-cadherin ($n=10$) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). Expression of markers of α-sma (C, D and E; original magnification × 200. Scale bar=100 μm, shown in C) and E-cadherin (F, G and H, original magnification × 1000. Scale bar= 20 μm, shown in F) shown by mesothelial cells from the omentum (C, F), adipose adhesion-derived cells (AA) (D, G) or fibrous adhesion-derived cells (FA) (E, H).

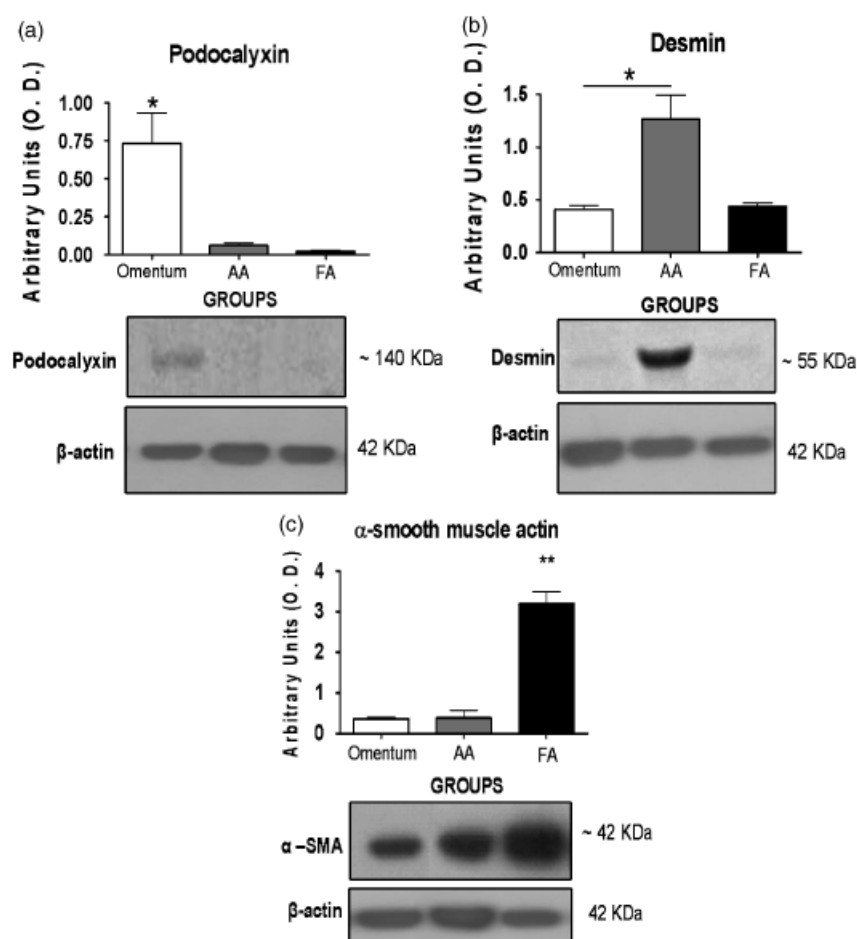


Figure 10. Western blots for (A) podocalyxin, (B) desmin and (C) α-smooth muscle actin (α-SMA) in cells derived from omentum ($n=10$), adipose adhesions ($n=10$) or fibrous adhesions (FA) ($n=10$) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). Mouse anti-β-actin antibody was used as a loading control and the intensity of its bands employed to normalize those of podocalyxin, desmin and α-SMA.

three cell populations in the first subculture. Several authors^{14,15} have described the presence of mesenchymal cells during the repair of large peritoneal defects supporting our hypothesis that the cells responsible for mesothelial regeneration are the same cells that give rise to adhesion tissue.

It has been argued¹⁶ that in conditions of ischemia mesenchymal cells are unable to proliferate and are therefore undetectable or diminished. This could determine that the mesothelium would be incapable of regenerating itself before adhesions formed. However, we believe that hypoxia is an inducing factor for migration on the fibrin matrix of cells of the surface in apposition to the ischemic zone. This supports a role for the mesenchymal mesothelial cells of the omentum in adhesion formation.

Kawaguchi et al.¹⁷ reported that differentiated cells of the serosa maintain their vasculogenic potential due to their differentiation into smooth muscle cells. This vasculogenic capacity is indeed supported by our observation of podocalyxin expression in 100% of the cells derived from the omentum. Podocalyxin is a marker of hematopoietic progenitors during development as well as progenitors of blood cells and vascular endothelium (hemangioblasts). We found that practically all the cells derived from the omentum were negative for CD31, indicating they were not endothelial cells but that they had the ca-

capacity to differentiate towards a vascular phenotype when subjected to the appropriate stimulus (as was found to occur in the adhesions).

The final finding supporting our working hypothesis concerns the memory of adhesion tissue. Cells from the first subculture maintain the phenotype acquired *in vivo*, allowing the study of their nature. We detected two different phenotypes of cells derived from adhesion tissue. This high plasticity shown *in vivo* suggests their mesenchymal nature. Their subsequent evolution towards two different types of adhesion tissue would therefore be determined by the given microenvironment.

In the fibrous type adhesions cells, we observed that all of them expressed α-SMA, but were negative for desmin and myosin. This is a distinctive feature of myofibroblasts responsible for tissue contraction and explains the greater deposition of collagen in this type of adhesion. Herrick¹⁸ previously reported the presence of isolated clusters of cells and isolated fibroblast-like cells between parallel collagen fibers immunoreactive for α-smooth muscle actin, suggesting a myofibroblast or smooth muscle cell phenotype in human peritoneal adhesions. Myofibroblast cell type has been demonstrated^{19,20} to be the final product of mesothelial transdifferentiation in response to stimulation or to high levels of the profibrotic factor TGF-β. Thus, the differentiation of the mesothelial mesenchymal cell

towards this cell type could be caused by a local highly inflammatory environment with high concentrations of cytokines and/or by the mechanical stress suffered by the cells embedded in the fibrin network joining two opposing peritoneal surfaces subjected to constant movement.

The absence of these two factors, a local inflammatory environment and mechanical stimulus, or their reduced intensity, at a given site, could explain the development of an adipose type adhesion, which maintains a similar morphology to the omental tissue from which they originate. These cells lack the marker of hemangioblasts, podocalyxin, noted in the mesothelial cells of the omentum but do show a greater proportion of cells positive for the specific endothelial marker CD31 and the CD9 marker. This last marker is characteristic of the cell components of blood, related to differentiation along the endothelial pathway and is expressed in vascular smooth muscle. In addition, they express smooth muscle cell markers such as α -SMA, desmin, and myosin. The expression of these markers can be correlated with differentiation into vascular cell lines and would explain the intense vascularization histologically observed in this tissue. This progress down the vascular smooth muscle pathway that occurs in vivo during the development of an adipose type adhesion is consistent with the behavior in culture of the cells obtained by Kawaguchi¹⁷ from explants of serosa.

In conclusion, the findings of our study performed on three different cell populations derived from an experimental model of adhesions (omental tissue, AA and FA) indicate that: (a) mesenchymal cells derived from adhesions (AA and FA) in culture show their activation/stimulation as they maintain the characteristic of a greater proliferative capacity than cells derived from the untouched omentum; (b) mesenchymal cells derived from adhesions (AA and FA) maintain the memory of the tissue from which they arose (expression of specific markers) in the first subcultures and a mesothelial morphology (characteristic of their progenitor cell population) up until the fifth passage; and c) the mesenchymal cells of the mesothelial layers responsible for the regeneration of the damaged mesothelium seem to be the same cells that give rise to adhesion tissue.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant from the Comision Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT MAT 2004-02114).

REFERENCES

- Vrijland WW, Jeekel J, Van Geldorp HJ, Swank DJ, Bonjer HJ. Abdominal adhesions: intestinal obstruction, pain, and infertility. *Surg Endosc* 2003; 17: 1017–22.
- Jeekel H. Cost implications of adhesions as highlighted in a European study. *Eur J Surg* 1997; 579 (Suppl): 43–5.
- Holmdahl L, Risberg B. Adhesions: prevention and complications in general surgery. *Eur J Surg* 1997; 163: 169–74.
- Cheong YC, Laird SM, Shelton JB, Ledger WL, Li TC, Cooke ID. The correlation of adhesions and peritoneal fluid cytokine concentrations: a pilot study. *Human Reprod* 2002; 17: 1039–45.
- Holmdahl L, Risberg B, Beck DE, Burns JW, Chegini N, diZerega GS, Ellis H. Adhesions: pathogenesis and prevention-panel discussion and summary. *Eur J Surg* 1997; 577 (Suppl.): 56–62.
- Mutsaers SE, Whitaker D, Papadimitriou JM. Mesothelial regeneration is not dependent on subserosal cells. *J Pathol* 2000; 190: 86–92.
- Foley-Comer AJ, Herrick SE, Al-Mishlab T, Prêle CM, Laurent GJ, Mutsaers SE. Evidence for incorporation of free-floating mesothelial cells as a mechanism of serosal healing. *J Cell Sci* 2002; 115: 1383–9.
- Ivarsson ML, Falk P, Holmdahl L. Response of visceral peritoneum to abdominal surgery. *Br J Surg* 2001; 88: 148–51.
- Boland GM, Weigel RJ. Formation and prevention of postoperative abdominal adhesions. *J Surg Res* 2006; 132: 3–12.
- Herrick SE, Mutsaers SE. Mesothelial progenitor cells and their potential in tissue engineering. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 621–42.
- Hernando A, García-Honduvilla N, Bellón JM, Buján J, Navlet J. Coatings for vascular prostheses: mesothelial cells express specific markers for muscle cells and have biological activity similar to that of endothelial cells. *Eur J Vasc Surg* 1994; 8: 531–6.
- Yáñez-Mó M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramírez-Huesca M, Domínguez-Jiménez C, Jiménez-Heffernan JA, Aguilera A, Sánchez-Tomero JA, Bajo MA, Álvarez V, Castro MA, del Peso G, Cirujeda A, Gamallo C, Sánchez-Madrid F, López-Cabrera M. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003; 348: 403–13.
- Saed GM, Zhang W, Diamond MP. Molecular characterization of fibroblasts isolated from human peritoneum and adhesions. *Fertil Steril* 2001; 75: 763–8.
- Lucas PA, Warejcka DJ, Zhang LM, Newman WH, Young HE. Effect of rat mesenchymal stem cells on development of abdominal adhesions after surgery. *J Surg Res* 1996; 62: 229–32.
- Bittinger F, Schepp C, Brochhausen C, Lehr HA, Otto M, Köhler H, Skarke C, Walgenbach S, Kirkpatrick CJ. Remodeling of peritoneal-like structures by mesothelial cells: its role in peritoneal healing. *J Surg Res* 1999; 82: 28–33.
- Rafferty AT. Regeneration of parietal and visceral peritoneum in the immature animal: a light and electron microscopical study. *Br J Surg* 1973; 60: 969–75.
- Kawaguchi M, Bader DM, Wilm B. Serosal mesothelium retains vasculogenic potential. *Dev Dyn* 2007; 236: 2973–9.
- Herrick SE, Mutsaers SE, Ozua P, Sulaiman H, Omer A, Boulous P, Foster ML, Laurent GJ. Human peritoneal adhesions are highly cellular, innervated, and vascularized. *J Pathol* 2000; 192: 67–72.
- Yang AH, Chen JY, Lin JK. Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int* 2003; 63: 1530–9.
- Selgas R, Bajo A, Jiménez-Heffernan JA, Sánchez-Tomero JA, Del Peso G, Aguilera A, López-Cabrera M. Epithelial-to-mesenchymal transition of the mesothelial cell-its role in the response of the peritoneum to dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21 (Suppl 2): ii2–7.

Manuscript Number: 20090318

Title: PERITONEAL ADHESION FORMATION AND REFORMATION TRACKED BY SEQUENTIAL
LAPAROSCOPY: OPTIMIZING THE TIME POINT FOR ADHESIOLYSIS

Article Type: Original Communication

Section/Category: Basic Research

Keywords: peritoneal adhesions; adhesion reformation; adhesiolysis; polypropylene mesh

Corresponding Author: Dr Juan Bellón, MD

Corresponding Author's Institution: University of Alcalá

First Author: Verónica Gómez-Gil, PhD

Order of Authors: Verónica Gómez-Gil, PhD; Natalio García-Honduvilla, PhD; Gemma Pascual,
PhD; Marta Rodríguez, PhD; Julia Buján, M.D., PhD; Juan Bellón, MD

Manuscript Region of Origin: SPAIN

Abstract: Background. In a high proportion of patients, surgically removed adhesions reform. Using an adhesiogenesis model, this study assesses the efficacy of adhesiolysis and examines how this relates to adhesion tissue composition at the time of resection.

Methods. Polypropylene meshes (5 x 3.5 cm) were implanted on the parietal peritoneum of New Zealand White rabbits. The animals were sacrificed 3, 7, 14 and 90 days postimplant to obtain adhesion tissue specimens. Adhesion formation/reformation was monitored by sequential laparoscopy in the animals culled at 90 days and in an experimental group of animals subjected to adhesiolysis at 3 days postimplant. Immune and inflammatory response markers were determined

by immunohistochemical, Western blotting and RT-PCR procedures in adhesion tissue and areas occupied by adhesions were quantified in meshes.

Results. In animals undergoing adhesiolysis, mesh areas covered by adhesions were significantly reduced at each follow up time and affected areas became mesothelialized. Increased TGF- β 1 expression was detected in adhesions at 3 days. Greatest TGF- β 1 and VEGF protein expression was observed at 7 days, while genetic overexpression was noted at 14 days. Active inflammatory cells peaked at the 7-day time point.

Conclusions. (a) Adhesions formed at 3 days. At this critical time, adhesiolysis was effective and adhesions did not reform; (b) TGF- β 1 gene and protein expression were increased in 3-day adhesions with respect to the omentum; (c) elevated active TGF- β 1 and VEGF levels at 7 days, along with the inflammatory response at this time point related to tissue remodeling led to adhesion tissue stabilization.